

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SYNTHÈSE DE GLYCOMIMÉTIQUES INHIBITEURS SÉLECTIFS
DES GALECTINES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
DENIS GIGUÈRE

AVRIL 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

“L’homme qui chaque jour,
accumule un grain de connaissance
finira par posséder une montagne de savoir.”

Je dédie ce mémoire
à mes parents.

REMERCIEMENTS

Beaucoup de travaux ont été réalisés durant cette maîtrise et beaucoup de personnes ont été importantes à mes yeux lors de ces années. Ce mémoire est finalement l'aboutissement de tout ce travail accompli qui n'aurait pu être possible sans l'appui de certaines personnes. Sincère remerciement à mon directeur de recherche, le Pr. René Roy pour m'avoir fait confiance, pour ses précieux conseils, sa patience et ses encouragements.

Par la suite, j'aimerais remercier mes parents de m'avoir supporté tout au long de mes études et pour avoir prié pour moi tous les jours de ma vie. Leurs encouragements m'ont permis de surmonter les multiples épreuves rencontrées. Bien entendu, j'aimerais remercier d'une façon toute particulière ma copine, Marilène, pour sa patience et surtout de m'avoir toléré pendant tout ce temps.

Je tiens à remercier spécialement tout ceux qui ont eu une grande influence pour moi lors de ma maîtrise : Dr Sanjoy K. Das, Neil Arya, Dr Bingcan Liu et Dr. Ramesh Patnam (« The Indian Association ») qui ont été des inspirations tant au niveau de la chimie qu'au niveau social. Dr. David Lagnoux, Isabelle Deguise, Patrick Mac Farlane et Dr. Mohamed Touaibia ont été les gens avec lesquels j'ai eu le plus d'affinité au laboratoire et je les remercie de m'avoir supporté. Finalement, tous les autres membres du laboratoire Roy: Alexandre, Bathelemy, Chichi, Gisela, Jonathan, Karima, Karine, Cathy, Marc-André, Qingan, Régis, Sanae et Sara. Parmi tous les professeurs invités qui ont travaillé dans nos laboratoires, j'aimerais remercier Dr. Ken Hatano avec qui j'ai passé de bons moments.

Sincère remerciement à Dr. Suzanne Sirois pour ses encouragements, ses conseils, les précieuses discussions que nous avons eues, ses magnifiques images et

son expertise en chimie quantique qui nous permettent de mieux comprendre la chimie médicinale.

Un gros merci au département de chimie et nos collaborateurs qui ont testé nos produits : Dr. Hans-Joachim Gabius, Dr. Sachiko Sato et Dr. Fred Brewer.

Finalement, ce projet a été réalisé avec le support du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG) pour une Chaire de Recherche du Canada en Chimie Thérapeutique décerné au Pr. René Roy.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTES DES SCHÉMAS.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTES DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xvii
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Introduction à la glycobiologie.....	1
1.2 Introduction aux galectines.....	6
1.3 Références.....	47
CHAPITRE II MANUSCRITS.....	56
2.1 Aryl <i>O</i> - and <i>S</i> -galactosides and lactosides as selective inhibitors of human galectins-1 and -3: role of the electrostatic potential at O-3.....	56
2.1.1 Résumé.....	57
2.1.2 Manuscrit.....	58
2.1.3 Références.....	68
2.1.4 Supporting information.....	71
2.2 Triazoles and isoxazoles as selective inhibitors of galectins-1 and -3.....	106
2.2.1 Résumé.....	107
2.2.2 Manuscrit.....	108
2.2.3 Références.....	115

2.2.4	Supporting information.....	118
2.3	Effects of Linker Rigidity and Orientation of Mannoside Clusters for Multivalent Interactions with Proteins.....	141
2.3.1	Résumé.....	142
2.3.2	Manuscrit.....	143
2.3.3	Références.....	159
2.4	A first QSAR model for Galectins-3 glycomimetic inhibitors based on 3D docked structures.....	162
2.4.1	Résumé.....	163
2.4.2	Manuscrit.....	164
2.4.3	Références.....	185
CHAPITRE III CONCLUSION.....		189
ANNEXE.....		192

LISTE DES FIGURES

1-1	Présentation des glycoformes à la surface cellulaire.....	2
1-2	Récepteur typique des glycosides à la surface cellulaire.....	3
1-3	Structure typique du résidu antigène Galili.....	4
1-4	Oligomérisation de la galectine-3 grâce à la formation d'agrégat à la surface des cellules.....	8
1-5	Représentation des domaines quaternaires des galectines : (a) homodimère (proto); (b) galectine-3 (chimère); (c) hétérodimère, tandem-répété. ⁵⁰	12
1-6	CRD de la galectine-1 complexé avec son ligand naturel (lactose, en noir) (PDB : 1SLT). ⁵² En bleue, on voit les feuillets- β et en jaune les acides aminés du CRD.....	14
1-7	(a) CRD de la galectine-3 (PDB : 1A3K) avec son ligand naturel LacNAc; bleu sont les surfaces concaves et brun les surfaces convexes; ⁵³ (b) ponts hydrogènes montrés en liens pointillés existant entre la lectine et le LacNAc ⁵⁴	15
1-8	Homologie des CRD de différentes galectines complexé avec la chaîne pentasaccharidique ganglioside GM ₁ . Chaque couleur est associée à un acide aminé ⁵⁶	16
1-9	(a) Diagramme de réseau de type 1 entre une lectine divalente et un ligand divalent; (b) réseau de type 2 entre une lectine tétravalente et un ligand divalent.....	18
1-10	Reconnaissance spécifique glycoside-protéine via l'effet multivalent. (a) et (b) récepteur di- et tétra-valent; (c) cluster de récepteur monovalent à la surface cellulaire; (d) et (e) récepteur oligomérique; (f) récepteur qui se lie à plus d'un glycoside à la fois.....	18
1-11	Galectine-3 en équilibre en présence et en absence d'un ligand glycoside multivalent et l'agrégation avec un glycoside tétravalent.....	19

1-12	Structure cristalline de 8 montrant l'interaction de type cation- Π avec l'ARG144 de la galectine-3.....	22
1-13	Benzamide C_2 symétrique possédant un K_d de 33 nM pour la galectine-3 profitant d'une double interaction de type cation- Π avec ARG144 et ARG186.....	22
1-14	Étude nOe du composé 36 prouvant l'inversion de configuration au C3 et C4.....	31
1-15	Possibilité de synthèse lors de l'utilisation de la réaction de PTC utilisée sur des glycosides.....	34
1-16	Modélisation moléculaire de 6f (voir manuscrit en section 2.2) montrant le groupe <i>o</i> -nitrophényle du dérivé lactoside sortant du site actif de la galectine-3. En rouge on voit les régions hydrophylques et en bleu les régions hydrophobiques.....	37

LISTE DES SCHÉMAS

1-1	(a) Synthèse d'analogues possédant des modifications en position-3' d'un dérivé LacNAc; (b) Meilleur inhibiteur de cette librairie où le benzamide 8 possède un IC ₅₀ de 4.4 µM.....	20
1-2	Chemin de synthèse conduisant à quatre différentes séries d'analogues où les composés 12 , 14 , 16 et 19 sont les meilleurs inhibiteurs de chaque librairie. (a) Synthèse de thiogalactosides; (b) synthèse de triazoles en position-3'; (c) synthèse d'aldoximes anomériques; (d) synthèse de thiourées en position-3'.....	24
1-3	Synthèse d'un inhibiteur de la galectine-3 possédant un IC ₅₀ de 21 µM pour la galectine-3.....	26
1-4	Synthèse d'un glycocluster C ₃ -symétrique possédant un IC ₅₀ de 30.8 µM pour la galectine-3.....	27
1-5	Analyse rétrosynthétique de l'hybride de deux bons inhibiteurs.....	28
1-6	Synthèse du galactosyle donneur 31	30
1-7	Synthèse du glucosyle accepteur 32	31
1-8	Suite de la synthèse de l'hybride 30 et synthèse d'analogues triazoles 45	33
1-9	Les deux formes tautomères d'un aminothiazoline.....	33
1-10	(a) Synthèse générale des <i>O</i> - et <i>S</i> -aryles glycosides; (b) meilleurs inhibiteurs (56) obtenu de la librairie.....	36
1-11	Mécanisme de la réaction de « click » pour la formation régiosélective d'un triazole. ⁸²	38
1-12	Synthèse du glycocluster C ₃ -symétrique possédant une propriété d'inhibition de 20 µM et 250 µM pour les galectines-1 et -3, respectivement.....	39

1-13	Synthèse d'un « cluster » trivalent, en une seule étape, catalysée par le réactif de Grubbs.....	40
1-14	Mécanisme de la réaction de cyclotrimérisation. ⁸⁶	41

LISTE DES TABLEAUX

1-1	Galactosides (ou polysaccharides terminant par un résidu galactose) et leurs structures, récepteurs et applications.....	5
1-2	Galectines des mammifères associées avec l'espèce de la découverte initiale et leurs structures.....	7
1-3	Noms et structures de différents saccharides naturels ayant des affinités pour les galectines. En foncé, on voit l'unité glycosidique nécessaire pour l'interaction. ⁴⁹	9
1-4	Constante d'affinité (K_d , mM) de différents saccharides naturels pour les galectines-1, -3 et -7. ⁴⁹	10
1-5	Récapitulation des meilleurs inhibiteurs monosaccharidiques de la galectine-3 associés avec leur pouvoir inhibiteur.....	44
1-6	Récapitulation des meilleurs inhibiteurs disaccharidiques de la galectine-3 associés avec leur pouvoir inhibiteur.....	45
1-7	Récapitulation des meilleurs inhibiteurs multivalents de la galectine-3 associés avec leur pouvoir inhibiteur.....	46

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

Ac	acétyl
AcCl	chlorure d'acétyl
Ac ₂ O	anhydride acétique
AcOH	acide acétique
ANN	réseau de neurone artificiel
Arg	arginine
Asn	asparagine
Boc	<i>t</i> -butoxycarbonyl
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -butyle
C	carbone
CH ₂ Cl ₂	dichlorométhane
CI	Ionization chimique
CRD	domaine de reconnaissance pour le glycoside
CTP	catalyse par transfert de phase
CuI	iodure de cuivre
d	doublet
DCM	dichlorométhane
dd	doublet de doublets
ddd	doublet de doublets dédoublés
DIPEA	diisopropyléthylamine

DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	diméthylformamide
ELISA	« enzyme-linked immunosorbent assay »
eq.	équivalent(s)
ESI	« electrospray ionisation »
EtOAc	acétate d'éthyle
EtOH	éthanol
Et ₃ N	triéthylamine
Fig	figure
GA	Algorithme génétique
Gal	galactose
GalNAc	<i>N</i> -acétylgalactosamine
Glc	glucose
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglucosamine
Glu	glutamate
His	histidine
Hz	hertz
IC ₅₀	concentration requise pour 50% d'inhibition
ITC	« isothermal titration calorimetry »
kDa	kiloDalton
Lac	lactose
LacNAc	<i>N</i> -acétyllactosamine

Lys	lysine
m	multiplet
M+	ion moléculaire parent
Me	méthyle
MeOH	méthanol
Min	minute(s)
mmol	millimolaire
mol	mole
PLS	« partial least square »
p.f.	point de fusion
py	pyridine
SM	spectrométrie de masse
<i>m</i> -CPBA	acide méta-chloroperoxybenzoïque
MW	masse moléculaire
<i>m/z</i>	ratio masse/charge
NIS	N-iodosuccinimide
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NMR	résonance magnétique nucléaire
O	oxygène
O.D.	densité optique
PCA	composant principal d'analyse
PCC	pyridinium chlorochromate

Ph	phényle
ppm	partie par million
<i>p</i> TSA	acide <i>para</i> -toluènesulfonique
QSAR	relation entre la structure et l'activité
Quant.	quantitatif
TA	température ambiante
s	singulet
t	triplet
TBAF	fluorure de tétrabutylammonium
TBASH	hydrogénosulfure de tétrabutylammonium
TFA	acide trifluoroacétique
TfOH	acide trifluorométhanesulfonique
THF	tétrahydrofurane
TMSOTf	triflate de triméthylsilyle
CCM	chromatographie sur couche mince
VIH	virus d'immunodéficience humaine
VVA	<i>Vicia villosa</i> (lectine)

RÉSUMÉ

Les galectines sont une famille de protéines cytosoliques possédant un domaine de reconnaissance pour les résidus β -D-galactosides et dont quatorze membres ont été identifiés chez les mammifères. Le rôle précis de ces lectines n'est pas très bien défini, mais tous les membres des galectines ont une très forte modulation de leurs expressions durant une étape de leurs développements spécifiques, sous différentes conditions physiologiques et pathologiques. Les galectines semblent être impliquées dans le processus d'apoptose, dans les réactions du système immunitaire et dans le processus de l'infection du VIH. Ainsi, une inhibition sélective de celles-ci pourrait mener à des traitements anti-cancers, anti-inflammatoires ou même anti-VIH. Dans le but de synthétiser des inhibiteurs sélectifs des galectines avec une augmentation de l'affinité, une réaction catalysée par transfert de phase a été utilisée pour la synthèse d'aryle *O*- et *S*-galactosides et lactosides. En plus d'obtenir des inhibiteurs ayant une affinité supérieure au ligand naturel, une corrélation a été découverte, soit entre la densité électronique de l'oxygène en position-3 du glucoside avec la propriété d'inhibition pour les dérivés lactosides pour la galectine-1. Ensuite, la synthèse régiosélective de dérivés triazoles et d'isoxazoles a aussi été exploitée pour l'obtention d'hétérocycles non-naturels dans le but de créer des interactions favorables avec les galectines. Le triazole C_3 -symétrique s'est avéré être le meilleur inhibiteur pour les galectines-1 et -3. De plus, l'exploitation d'espaces rigides a été utilisée dans le but de synthétiser des inhibiteurs avec une augmentation de la sélectivité vis-à-vis la Concanavalin A. Des métaux de transition ont été utilisés tels que le palladium(0) pour la réaction de Sonogashira et l'octacarbonyle de dicobalt pour une réaction de benzannélation à partir de mannosides acétyléniques. Cette méthode peut être appliquée pour d'autres protéines ou lectines telles que les galectines. Finalement, le premier modèle QSAR pour la galectine-3 a été développé dans le but de concevoir une base de données fiable pour le développement de futurs antagonistes sélectifs de la galectine-3. L'étude réalisée suggère que les interactions non-covalentes telles que la lipophilie et la structure de l'inhibiteur sont des points importants pour l'obtention d'un inhibiteur sélectif de la galectine-3.

Mots-clés : galectine, glycochimie, cycloaddition, catalyse par transfert de phase

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Introduction à la glycobiologie

Les résidus glycosidiques existent en grande quantité sur la surface de toutes les cellules et dans l'espace extracellulaire sous forme de glycolipides, glycoprotéines et protéoglycanes (figure 1-1).¹

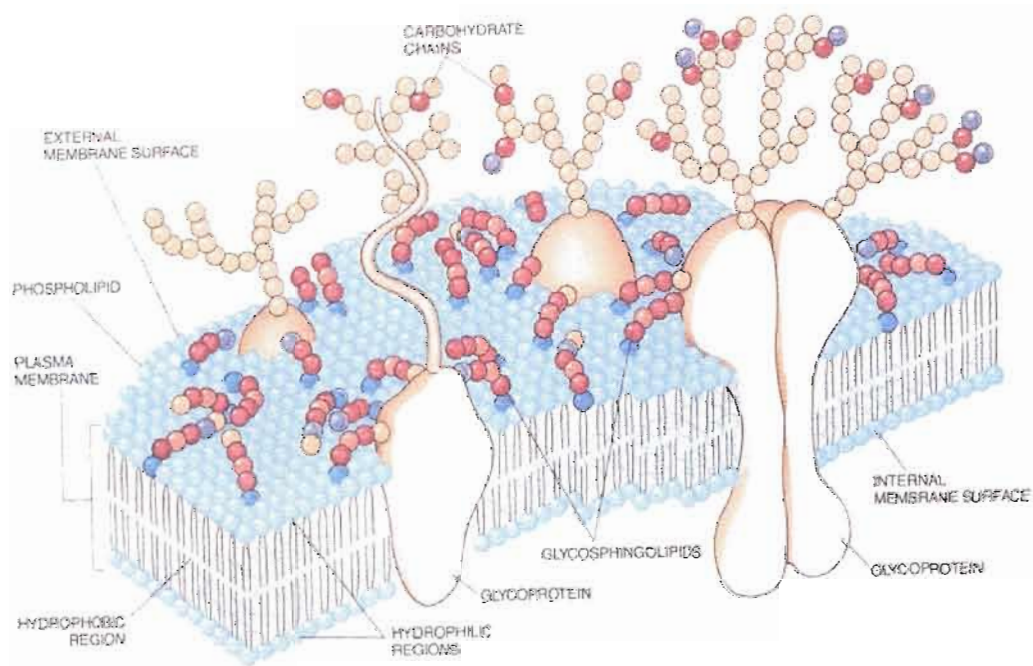


Figure 1-1 Présentation des glycoformes à la surface cellulaire.¹

L'interaction entre un glycoside et une protéine contribue à plusieurs événements biologiques importants tels que l'adhésion cellulaire, les infections pathogéniques, la régulation de la croissance, les processus internes, l'apoptose cellulaire et la xénotransplantation.² Comme ligand, les glycoformes peuvent se lier avec différents types de récepteurs tels que les lectines, les virus, les bactéries, les anticorps et les toxines et peuvent jouer un rôle essentiel dans la reconnaissance moléculaire et cellulaire (figure 1-2).^{2e, 3}

Reconnaissance Moléculaire des Saccharides à la Surface Cellulaire

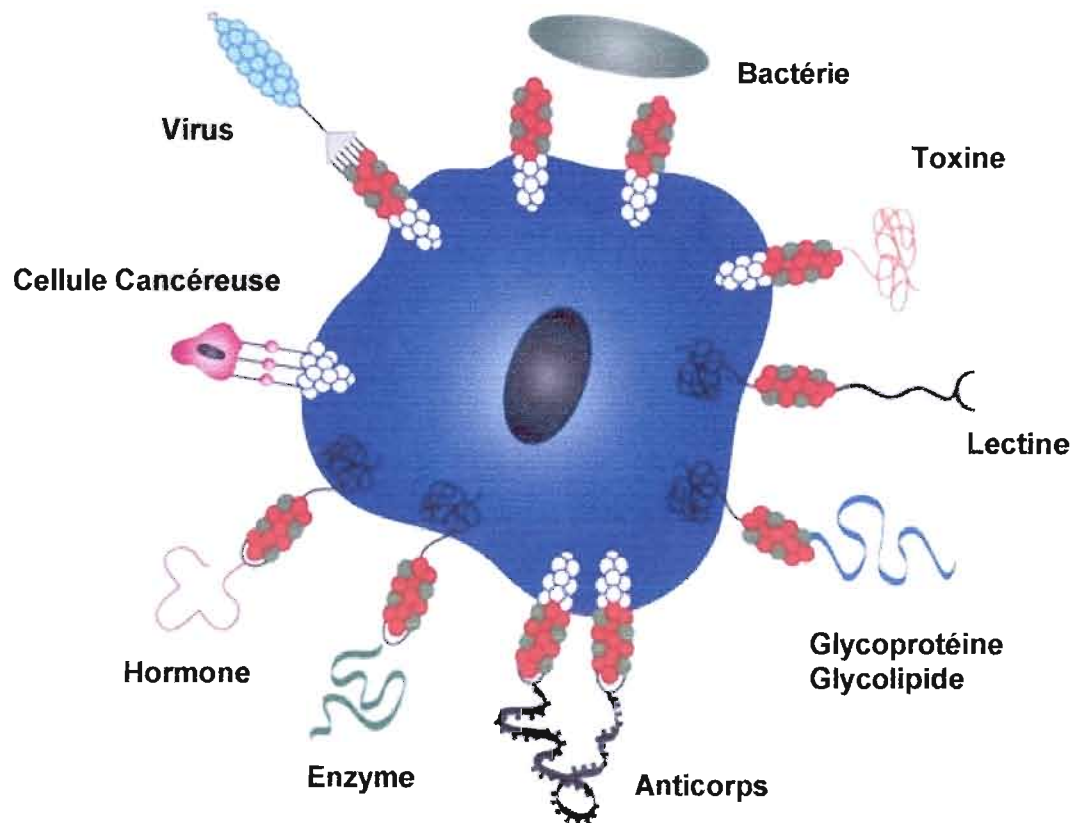


Figure 1-2 Récepteurs typiques des glycosides à la surface cellulaire.³

Il a été montré que différentes unités saccharidiques en fonction de différents glycosides et liens glycosidiques ont des activités biologiques spécifiques. Par exemple, l'antigène de Galili ou le résidu α -Gal (sous forme de $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta\text{-R}$, $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$ et $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta\text{-R}$) est présent abondamment à la surface des organes de plusieurs organismes vivants à l'exception des humains et des singes (Grands singes, singes du Vieux Continent, singes du Nouveau Monde et Prosimiens) (figure 1-3).⁴ Les anticorps humains anti α -Gal peuvent être reconnus et ciblés chez les humains, ceux-ci sont responsables du rejet des greffes de xénotransplantation. De plus, le galabiose ($\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}$) présent dans les glycolipides est responsable de l'adhésion et de l'infection pathogénique de *E. coli* et de *S. suis*.⁵ Les résidus β -galactosides peuvent aussi interagir avec les galectines pour réguler une multitude de processus qui seront décrits plus en détail dans ce travail.

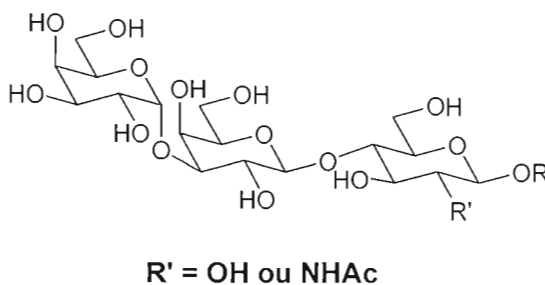


Figure 1-3 Structure typique du résidu antigène de Galili.

Basé sur l'interaction entre un ligand glycosidique et son récepteur, il est logique de penser qu'on peut utiliser des glycosides synthétiques pour moduler ou bloquer une certaine fonction biologique en mimant le substrat naturel. Ainsi, il serait possible de développer des antagonistes de cibles thérapeutiques potentielles comme des inhibiteurs d'enzymes. En tant que sondes moléculaires, les composés

synthétiques sont utilisés pour comprendre la base de la glycochimie qui est utile pour le développement de bons inhibiteurs enzymatiques ou d'antagonistes de récepteurs.⁶ Le galactose ou les résidus se terminant par le galactose, comme les α -Gal, lactose, LacNAc, galabiose, Gb₃, *etc*, ont des activités biologiques significatives et sont impliqués dans de nombreux processus biologiques (tableau 1-1). Leurs récepteurs sont d'autant plus importants puisqu'ils constituent des cibles pharmacologiques importantes. Le développement de médicaments basé sur des glycosides n'est pas très populaire parce que ceux-ci ne possèdent pas les principales caractéristiques d'une drogue (« drug-like »). L'intérêt est donc de faire des glycomimétiques pour obtenir des molécules qui rencontrent les critères de Lipinsky⁷. Ce travail portera sur la synthèse de glycomimétiques stables qui se comportent en inhibiteurs sélectifs des galectines humaines.

Tableau 1-1 Galactosides (ou polysaccharides se terminant par un résidu galactose) et leurs structures, récepteurs et applications.

Résidus glycosidiques	Structures	Récepteurs	Applications	Réf.
β -Galactoside	Gal β	Asialoglycoprotéine récepteur, galectines	Anticancer, modèle étudié	8
α -GalNAc	GalNAc α	Asialoglycoprotéine récepteur, lectine (<i>Vicia villosa</i>)		9
N-glycanes	Gal(α 1-4)Gal	PA-IL	Fibrose kystique	10
Galabiose	Gal(α 1-4)Gal β	<i>S. suis</i> , <i>E. coli</i>		11
Lactose	Gal(β 1-4)Glc β	Galectines	Anticancer	12
LacNAc	Gal(β 1-4)GlcNAc β	Lectine (<i>E. cristagalli</i>)		13
Mélibiose	Gal(α 1-6)Glc	Anti α -Gal anticorps	Xénotransplantation	14
T-antigène	Gal(β 1-3)GalNAc α	IgG3, IgM	Vaccin anti cancer	15
B-disaccharide	Gal(α 1-3)Gal β	Anti-B IgG		16
α -Gal	Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GalNAc β	Anti α -Gal anticorps	Xénotransplantation	17
Gb ₃ trisaccharide	Gal(α 1-4)Gal(β 1-4)Glc β	Toxines Shiga, Toxine choléra		18
isoGb ₃ trisaccharide	Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)Glc β	Toxine A (<i>Clostridium difficile</i>)		18b
GM1	Gal(β 1-3)GalNAc(β 1-4)[Neu5Ac(α 2-3)]Lactose	Cholera toxine B; <i>E. coli</i> toxine		19

1.2 Introduction aux galectines

« God must love galectins;
He made so many of them »

- D. N. W. Cooper et
S. H. Barondes

Depuis les cinq dernières années les recherches effectuées sur la famille des galectines ont émergées de façon impressionnante et ont permis de leur attribuer une multitude de fonctions. Le sujet est plutôt récent et c'est en 1994 que le nom général a été donné à cette famille de lectines.²⁰ Les galectines (aussi connues sous le nom de lectines de type-S) sont des protéines situées dans le cytosol ou dans l'espace extracellulaire, qui ont un domaine de reconnaissance pour les résidus β -D-galactopyranosides. Quatorze membres font partie de cette famille chez les mammifères et sont nommés selon l'ordre chronologique de leurs découvertes (un à quatorze). Très récemment, une nouvelle lectine s'est vue attribuer le nom de galectine-15.²¹ Le tableau 1-2 montre les espèces et organes dans lesquelles les galectines des mammifères ont été découvertes, associées avec leurs classifications structurales. Chaque galectine possède un domaine de reconnaissance pour les glycosides (CRD), d'environ 130 acides aminés, qui est hautement conservé (20 à 40%)^{20a, 26, 33} et certaines études, basées sur la similarité des séquences, estiment qu'il peut en exister davantage.³³ Plusieurs protéines ont des similarités séquentielles avec les galectines, mais ne possèdent pas les résidus critiques pour former l'interaction avec le ligand naturel.³⁴ Ceci suggère que les galectines constituent un sous groupe de protéines plus larges et leurs membres peuvent inclure d'autres pentraxines (molécules ancestrales de l'inflammation). Comme mentionné précédemment, la localisation des galectines ne se limite pas au cytoplasme,³⁶ mais aussi à l'espace extracellulaire,³⁷ dépendamment de la nature de la galectine. Ces dernières montrent un large éventail de distributions biologiques autant chez les vertébrés que chez les

invertébrés, incluant les nématodes, les insectes, les éponges et les champignons.³⁸ Leurs expressions sont régulées durant le développement de ces organismes. C'est à dire que la biosynthèse des lectines, dans un tissu donné, prend place seulement durant une étape de développement pathologique ou physiologique bien spécifique.³⁹ Bien qu'il n'a pas encore été montré clairement que toutes les galectines ont des fonctions en commun, toutes les galectines ont leurs expressions durant un développement particulier.⁴⁰ La figure 1-4 montre trois exemples d'interactions entre la galectine-3 avec différents récepteurs.

Tableau 1-2 Galectines des mammifères associées avec l'espèce de la découverte initiale et leurs structures.

Galectines	Espèce ou organe trouvé	Classification structurale	Référence
1	Présent dans les tissus des	Homodimère	20
2	mammifères : os et muscle cardiaque	Homodimère	20
3	(gal-1), « hepathomas » (gal-2),	Monomère	20
4	intestin, rein (gal-3) et épithélium	Hétérodimère	20
5	intestinal (gal-4).		
5	Érythrocytes de poumon de souris	Homodimère	22
6	Voie gastro-intestinale de souris	Hétérodimère	23
7	Épiderme humain	Homodimère	24
8	Tissu sain, tumoral et péritumoral	Hétérodimère	25
9	Rein d'embryon humain	Hétérodimère	26
10	Sang de patient leucémique	Homodimère	27
11	Éponge Axinella	Homodimère	28
12	Cellules de cancer du sein	Hétérodimère	29
13	Tissu placentaire	Homodimère	30
14	Glande mammaire humaine	Homodimère	31
15	Tissu utéroplacentaire de bovin	Homodimère	32

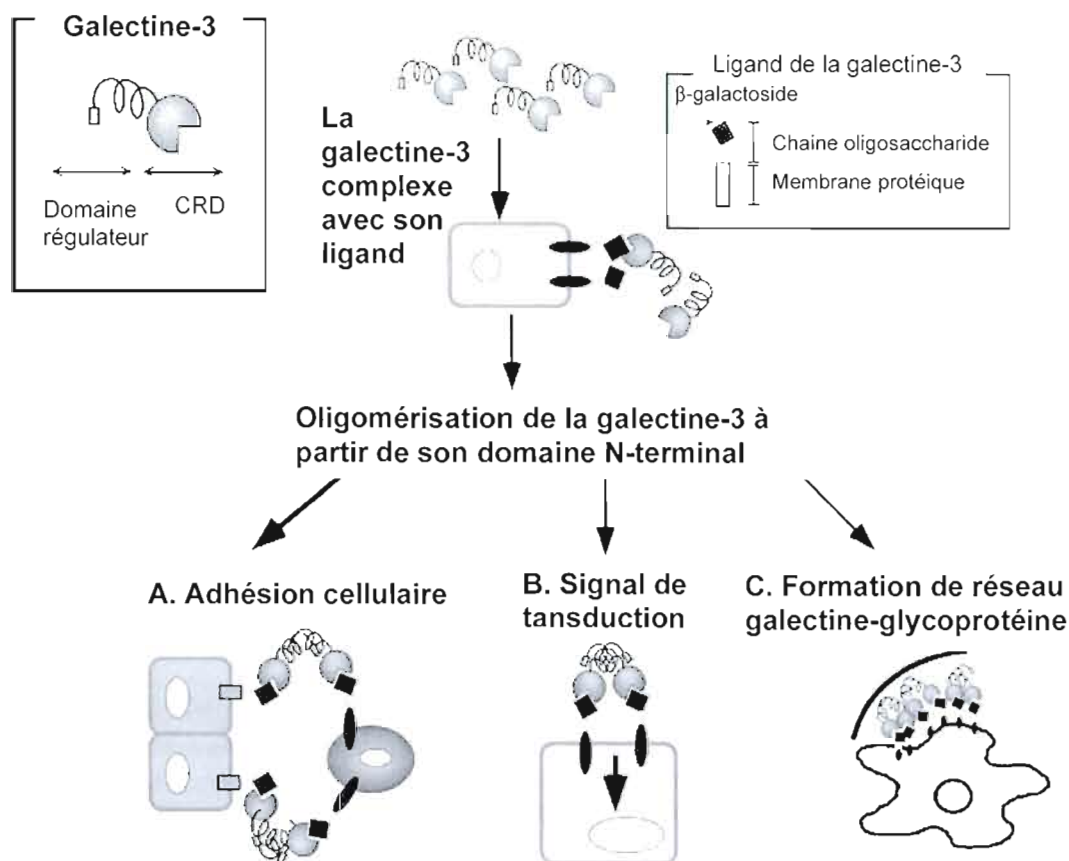


Figure 1-4 Oligomérisation de la galectine-3 grâce à la formation d'agrégats à la surface des cellules.^{43a}

Les galectines-1 et -3 sont probablement les plus étudiées parmi toute la famille. Le nombre de publications attribuant des rôles biologiques aux galectines a augmenté rapidement durant les dernières années et leurs principaux rôles se situent au niveau de l'apoptose et du système immunitaire. La galectine-3 semble impliquée dans le cancer du colon,⁴¹ dans la progression des tumeurs crâniennes,⁴² dans l'inhibition de l'adhésion des métastases des cellules cancéreuses⁴³ et semble impliquée dans le système immunitaire.⁴⁴ La régulation de l'apoptose n'est pas attribuable seulement à la galectine-3,⁴⁵ la galectine-1⁴⁶ semble aussi réguler le processus de l'apoptose cellulaire.⁴⁷ La galectine-1 agit aussi en tant que promoteur

soluble qui induit l'infection au VIH-1 par la stabilisation du virus attaché à la cellule hôte.⁴⁸ Ainsi, une inhibition sélective de certaines galectines pourrait mener à des traitements anti-cancer, anti-inflammatoire, ou même anti-viral.

Il existe plusieurs ligands naturels des galectines, les plus connus sont probablement le LacNAc, le lactose et le galactose. Tout résidu saccharidique se terminant par une unité galactoside peut se lier à n'importe quel membre de la famille des galectines. Le tableau 1-3 montre les différents noms et structures des ligands naturels des galectines. Notons que la majorité de ces saccharides ont un galactose ou un acide sialique comme unité terminale (en gras dans le tableau).

Tableau 1-3 Noms et structures de différents saccharides naturels ayant des affinités pour les galectines. En foncé, on voit l'unité glycosidique nécessaire pour l'interaction avec la lectine.⁴⁹

Nom	Structure
Lactose	Gal β(1-4)Glc~OH
Methyl β-Lactoside	Gal β(1-4)GlcβOCH ₃
LacNAc-I	Gal β(1-3)GlcNAc~OH
LacNAc-II	Gal β(1-4)GlcNAc~OH
Methyl β-LacNAc-I	Gal β(1-3)GlcNAcβ(1-)OCH ₃
Methyl β-LacNAc-II	Gal β(1-4)GlcNAcβ(1-)OCH ₃
ThiodiGal	Gal β(1-1)βGal
DiLacNAc	Gal β(1-4)GlcNAcβ(1-3)Galβ(1-4)GlcNAc~OH
TriLacNAc	Gal β(1-4)GlcNAcβ(1-3)Galβ(1-4)GlcNAcβ(1-3)Galβ(1-4)GlcNAc~OH
Lacto-N-tetraose	Gal β(1-3)GlcNAcβ(1-3)Galβ(1-4)Glc~OH
Lacto-N-neo-tetraose	Gal β(1-4)GlcNAcβ(1-3)Galβ(1-4)Glc~OH
2,3-Sialyl LacNAc	Neu5Ac α(2-3)Galβ(1-4)GlcNAc~OH
2,6-Sialyl LacNAc	Neu5Ac α(2-6)Galβ(1-4)GlcNAc~OH
2,6-Sialyl DiLacNAc	Neu5Ac α(2-6)Galβ(1-4)GlcNAcβ(1-3)Galβ(1-4)GlcNAc~OH
2,6-Sialyl Lacto-N-neo-tetraose	Neu5Ac α(2-6)Galβ(1-4)GlcNAcβ(1-3)Galβ(1-4)Glc~OH
« Trisaccharide »	GlcNAc β(1-3)Galβ(1-4)Glc~OH

Les ligands naturels des galectines mentionnés dans le tableau 1-3 ont différentes affinités avec les galectines. Le tableau 1-4 montre les constantes d'association (mM) obtenues lors d'une étude thermodynamique de quelques saccharides avec trois galectines (-1, -3 et -7).⁴⁹

Tableau 1-4 Constante d'affinité (K_d , mM) de différents saccharides naturels pour les galectines-1, -3 et -7.⁴⁹

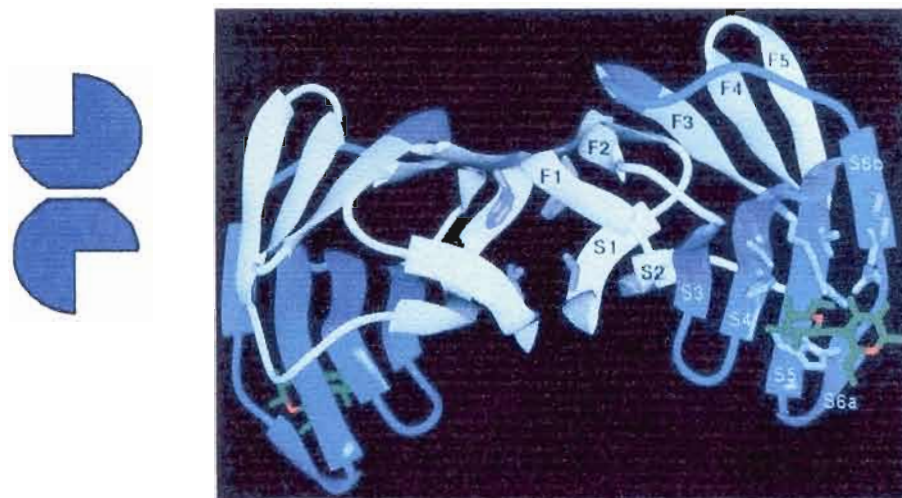
Saccharides	Galectine-1 ^a	Galectine-3 ^a	Galectine-7 ^a
LacNAc-I	0.90	0.82	nd
LacNAc-II	1.1	1.9	0.17
ThiodiGal	1.8	0.98	0.40
DiLacNAc	0.74	3.5	0.74
TriLacNAc	2.2	6.3	0.65
Lacto-N-tétraose	1.0	2.6	nd
2,3-Sialyl LacNAc	2.3	3.3	nd
Lactose	0.61	nd	0.22
2,6-Sialyl Lacto-N-néotétraose	nd	2.1	nd
2.6-Sialyl DiLacNAc	nd	4.8	nd
Trisaccharide	nd	0.88	nd

^a : nd = non-déterminé

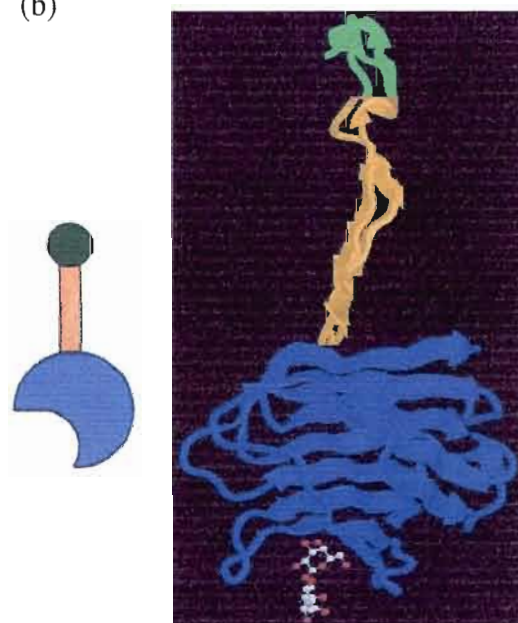
Il est important de remarquer que tous les inhibiteurs ont une faible constante d'affinité, de l'ordre du millimolaire. C'est pourquoi il est nécessaire de faire des glycomimétiques pour augmenter l'affinité avec les galectines. De plus les ligands naturels obtiennent une certaine sélectivité avec les différentes galectines. Par exemple, le triLacNAc possède un K_d (mM) de 2.2 pour la galectine-1 et de 6.3 et 0.65 pour les galectines-3 et-7, respectivement. Ces valeurs sont relativement différentes pour un même substrat et nous laissent croire qu'il serait possible d'obtenir une sélectivité d'inhibition pour un même ligand synthétique.

Deux critères doivent être pris en considération pour inhiber une lectine: sa structure quaternaire et la structure de son CRD. La structure quaternaire des galectines permet de les classer selon trois différents types architecturaux : proto, chimère et tandem-répété, montrés en figure 1-5.⁵⁰ Dans tous les cas, les CRD sont similaires pour les trois arrangements (130 acides aminés montrés en bleu) et sont riches en proline, glycine et tyrosine. L'arrangement proto est constitué de deux galectines identiques (un CRD par sous unité) formant des dimères (homodimères) liés de façon non covalente (figure 1-5.a).⁵¹ Les galectines-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13 et -14 en font parties. Ensuite, seule la galectine-3 fait partie de l'architecture chimère (figure 1-5.b) où le *C*-terminal est semblable au type proto, mais le *N*-terminal contient une terminaison différente d'une trentaine d'acides aminés (montré en vert). La galectine-3 peut complexer avec une unité galactoside via son CRD, mais aussi se lier avec un domaine non-lectine (hélice de collagène d'une centaine d'acides aminés, en orange). Cet arrangement permet l'oligomérisation en présence ou en absence de ligands multivalents et la formation d'agrégats (discuté en détails plus loin dans l'introduction). Finalement, l'arrangement tandem-répété est constitué de deux galectines différentes liées entre elles via leurs acides aminés *N*-terminaux (une trentaine d'acides aminés) sous forme hétérodimérique (figure 1-5c). Les galectines-4, -6, -8, -9, -12 sont disposées de cette façon.

(a)



(b)



(c)

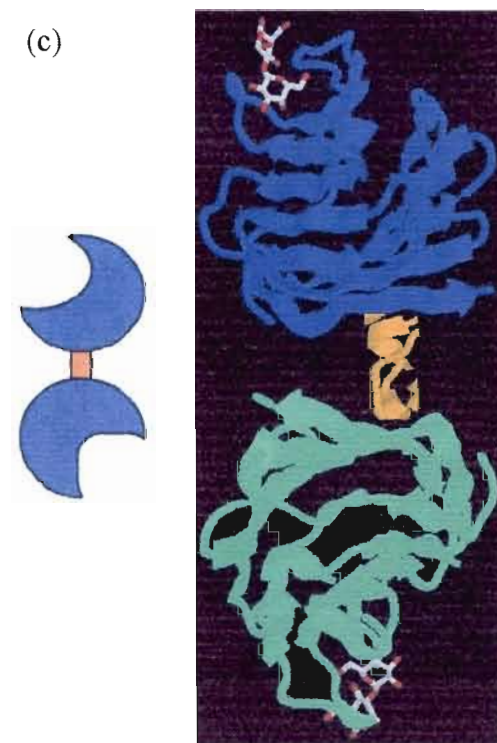


Figure 1-5 Représentation des domaines quaternaires des galectines : (a) homodimère (proto); (b) galectine-3 (chimère); (c) hétérodimère, tandem-répété.⁵⁰

La conservation de certains acides aminés au niveau du site actif est une signature architecturale rencontrée chez les galectines. La majorité des interactions lectine/ligand-naturel se fait à partir de l'unité galactoside et, dans le cas de la galectine-1, avec les résidus His44, Arg48 et Asn46 (figure 1-6).⁵² Le résidu Asn46 est impliqué dans un pont hydrogène avec l'hydroxyle en C3 du galactose via une molécule d'eau. L'oxygène endocyclique en O5 lie l'Arg48 via un pont hydrogène et l'hydroxyle en C6 interagit avec l'Asn61 et le Glu71. Le résidu Trp68 participe à une interaction de type hydrophobe avec les C3, C4 et C5 en dessous du cycle galactosidique. Cette interaction est cruciale pour la liaison de la lectine avec un résidu galactose plutôt qu'avec une unité glucosidique. L'interaction de l'unité glucosidique avec la protéine est moins importante, cependant tous les ponts hydrogènes directs se font à partir de l'hydroxyle en O3 (avec l'Arg48 et le Glu71). Cet effet est tellement important qu'il existe une corrélation entre le potentiel électrostatique en O3 du résidu glucosidique et la propriété d'inhibition (décrit dans la section 2.1). Le CRD de la galectine-3 (figure 1-7) avec son ligand naturel (LacNAC) est très similaire avec celle de la galectine-1 et ne sera pas détaillé.⁵⁵ Les flèches représentent les cavités où l'introduction de pharmacophores peut être possible. Il est cependant important de noter que les résidus Arg144 et Arg 186 (présents dans le site actif) peuvent être utilisés comme atouts importants pour l'inhibition de la galectine-3 et ont été exploités par le groupe de Nilsson. Pour bien illustrer la similarité des CRD de quelques galectines, la figure 1-8 présente les acides aminés les plus conservés des sites actifs. La similarité des sites actifs des galectines est un autre aspect important pour le développement d'un candidat sélectif. Le défi est d'autant plus grand que les galectines ont des fonctions biologiques différentes.

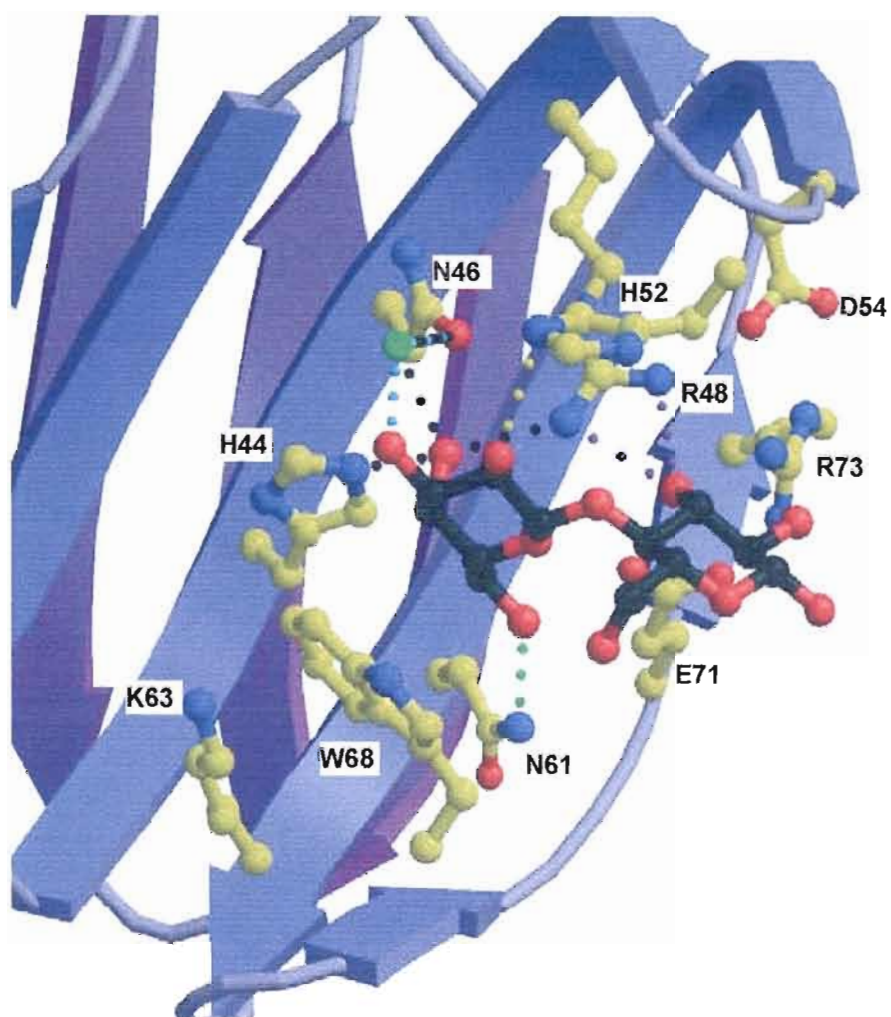
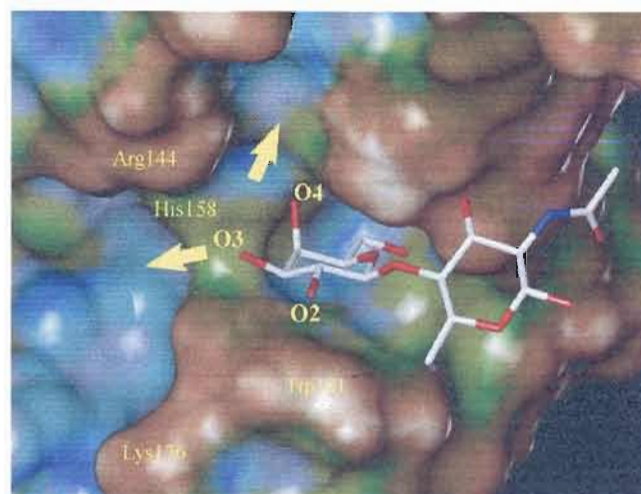


Figure 1-6 CRD de la galectine-1 complexé avec son ligand naturel (lactose, en noir) (PDB : 1SLT).⁵² En bleu, on voit les feuillets- β et en jaune les acides aminés du CRD.

a)



b)

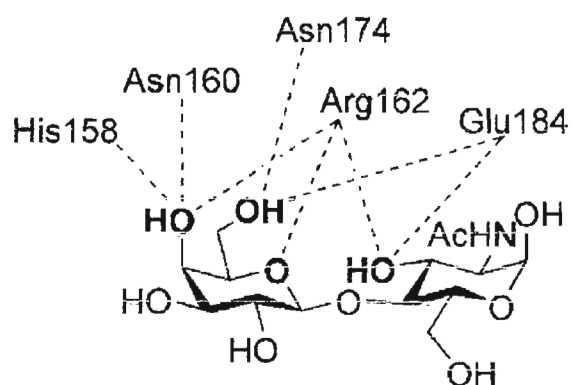


Figure 1-7 (a) CRD de la galectine-3 (PDB:1A3K) avec son ligand naturel LacNAc; bleu sont les surfaces concaves et brun les surfaces convexes;⁵³ (b) ponts hydrogènes montrés en liens pointillés existant entre la lectine et le LacNAc⁵⁴.

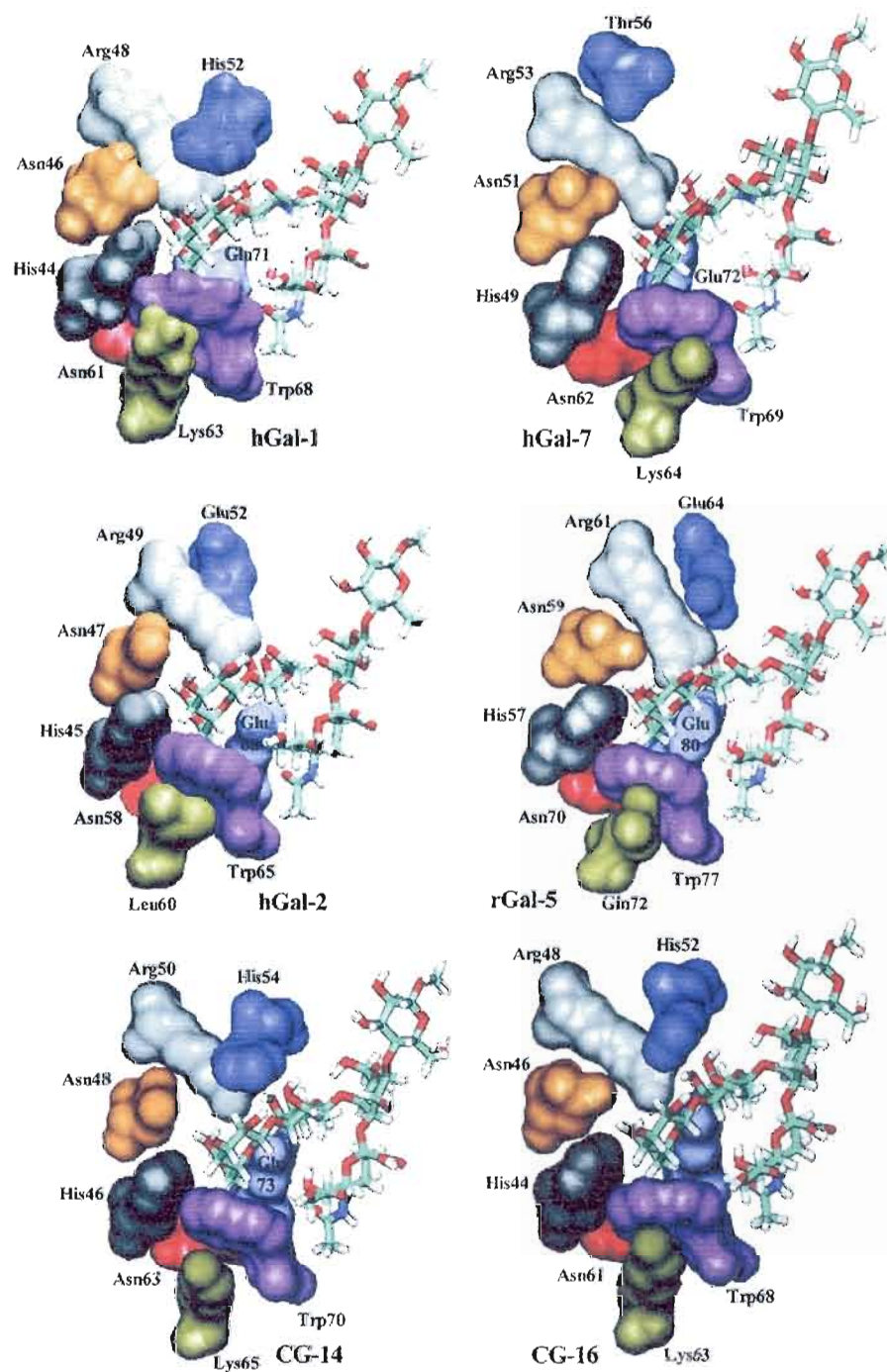


Figure 1-8 Homologie des CRD de différentes galectines complexées avec la chaîne pentasaccharidique du ganglioside GM₁; chaque couleur est associée à un acide aminé.⁵⁶

Une des conséquences directes de l'architecture des galectines est probablement la relation qu'elles entretiennent avec leurs fonctions. L'architecture réglera l'interaction avec son ligand et déterminera la fonction de cette lectine. Certaines études ont démontré que la reconnaissance multivalente des galectines résulte en la formation de réseaux tridimensionnels avec des saccharides multivalents et des glycoconjugués.⁵⁷ Par exemple, la figure 1-9a montre la formation d'un complexe unidimensionnel (type 1) entre une lectine dimérique et un ligand divalent. Ces interactions forment un complexe soluble avec un haut degré de polymorphisme, causé par la flexibilité. Un réseau de type 2 (figure 1-9b) est constitué de molécules possédant une valence supérieure à deux. Une lectine tétravalente forme un réseau tridimensionnel avec son ligand divalent. La formation de dimères par les lectines permet l'agrégation ou l'agglutination à la surface des cellules liées aux glycosides membranaires par des interactions non-covalentes.⁵⁸ Plusieurs recherches ont été effectuées sur les structures quaternaires des galectines,⁵⁹ sur la multivalence des galectines⁶⁰ et sur des études thermodynamiques.^{49, 61} La connaissance de la multivalence des lectines peut être utile pour réguler l'interaction entre une lectine et son ligand. Il est connu que l'affinité entre un glycoside monovalent et son récepteur est intrinsèquement petit et possède des constantes d'affinité de l'ordre du millimolaire.⁶² Pour contrer ce problème, l'effet multivalent (« cluster effect ») permet de compenser une faible constante d'association du glycoside (figure 1-10).⁶³ Cet effet est présent chez les galectines et spécialement chez la galectine-3.⁵⁹⁻⁶¹ Son architecture chimère lui permet de former un complexe soluble en présence et en l'absence d'un ligand. Si le ligand est multivalent, il y a formation d'un complexe insoluble qui devient la force motrice pour l'inhibition de cette lectine (figure 1-11).

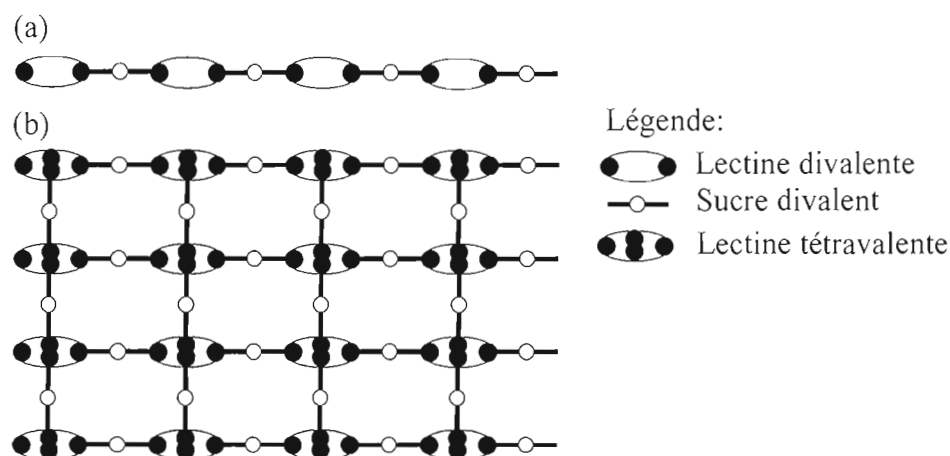


Figure 1-9 (a) Diagramme de réseaux de type 1 entre une lectine divalente et un ligand divalent; (b) réseau de type 2 entre une lectine tétravalente et un ligand divalent.

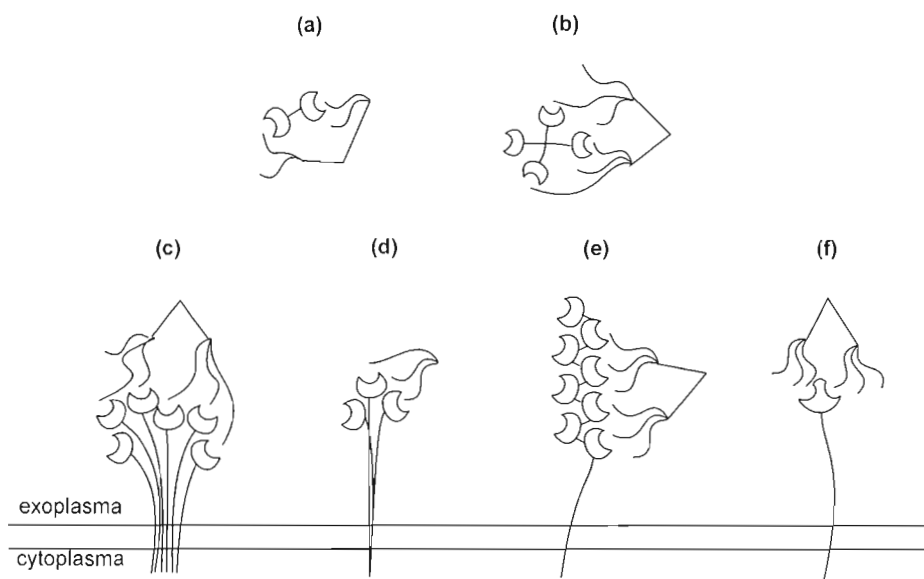


Figure 1-10 Reconnaissance spécifique glycoside-protéine via l'effet multivalent. (a) et (b) récepteur di- et tétra-valent; (c) cluster de récepteur monovalent à la surface cellulaire; (d) et (e) récepteur oligomérique; (f) récepteur qui se lie à plus d'un glycoside à la fois.

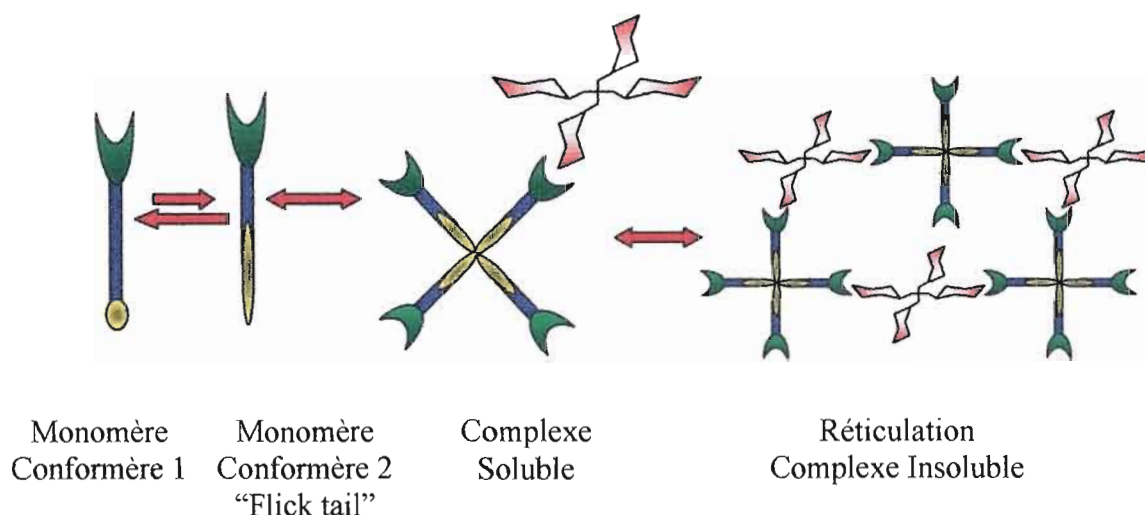


Figure 1-11 Galectine-3 en équilibre en présence et en absence d'un ligand glycoside multivalent et l'agrégation avec un glycoside tétravalent.

La stratégie de l'effet multivalent pour inhiber une protéine a été utilisée et étudiée à maintes reprises dans nos laboratoires sur différentes lectines⁶⁴ et galectines.^{60b, 60c, 65} Cette stratégie n'est pas la seule employée pour l'inhibition des galectines et d'autres groupes de recherche ont entrepris la synthèse d'analogues pour inhiber sélectivement les galectines. La synthèse d'analogues est nécessaire pour deux raisons majeures : comme mentionné précédemment les substrats naturels des galectines ont une faible constante d'affinité avec leurs récepteurs et les substrats naturels n'ont presque aucune sélectivité envers les différentes galectines. Il est donc nécessaire de faire des analogues de glycomimétiques pour obtenir une meilleure constante d'affinité avec les lectines et obtenir une sélectivité pour l'inhibition d'une galectine spécifique.

La prochaine section portera sur les approches utilisées par les différents groupes de recherche pour inhiber sélectivement une galectine.

Le groupe de recherche ayant fait des inhibiteurs possédant une constante d'affinité de l'ordre du nanomolaire est celui de Nilsson *et al.*^{53, 54, 66} Au point de vu synthétique, le schéma-1.1(a) montre le chemin de synthèse de la formation d'analogues réalisé, par le groupe de Nilsson,⁵³ possédant des modifications en positions-3'.

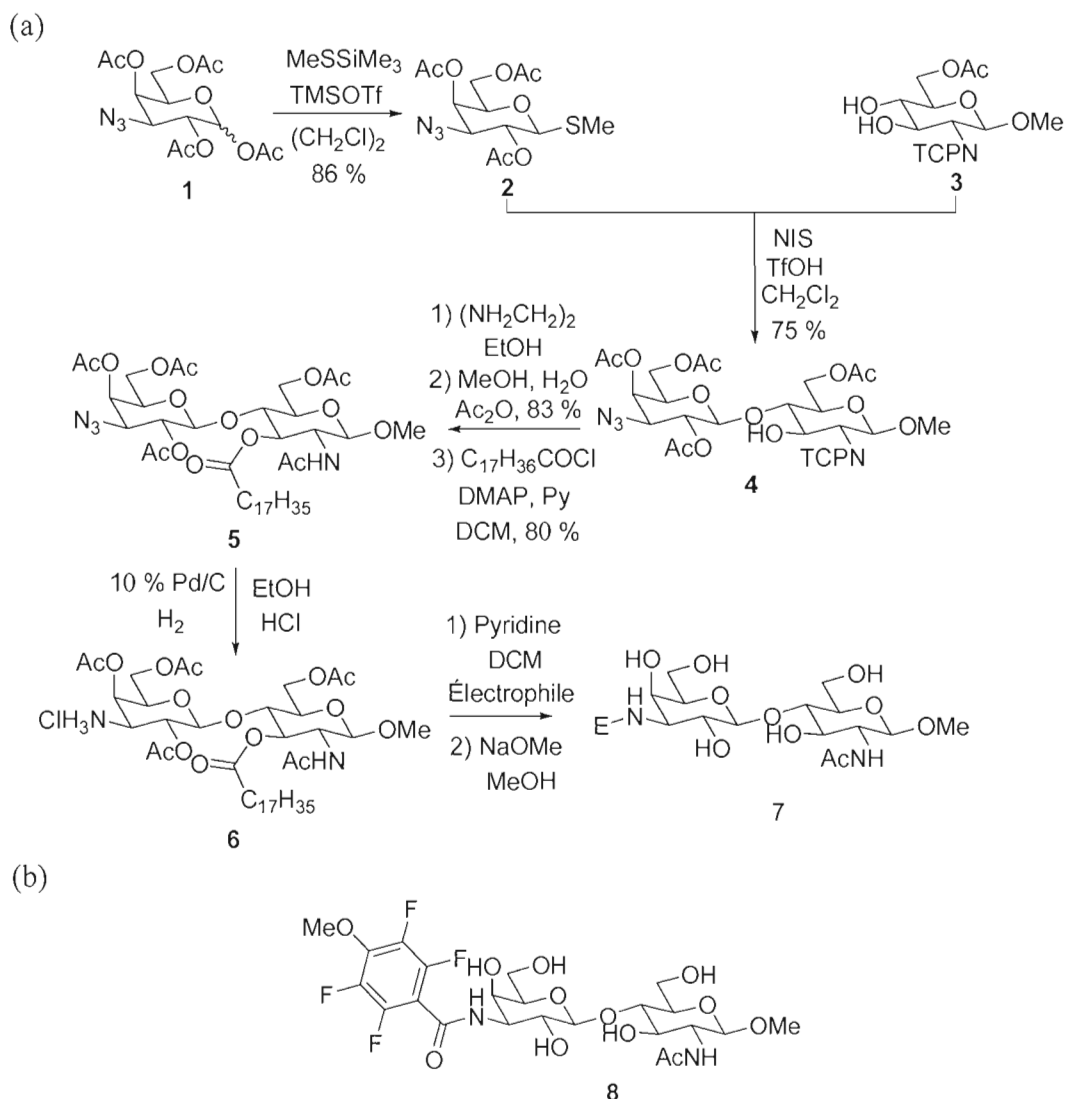


Schéma 1-1 (a) Synthèse d'analogues possédant des modifications en position-3' d'un dérivé LacNAc; (b) Meilleur inhibiteur de cette librairie où le benzamide **8** possède un IC₅₀ de 4.4 μM.

Cette séquence synthétique est importante parce que d'autres inhibiteurs de la galectine-3, de Nilsson, proviennent des mêmes intermédiaires. L'azoture galactosylé **1**⁶⁷ (mélange d'anomères) a formé le β -thiogalactoside **2** en présence d'un acide de Lewis via l'effet anchimérique. Le couplage glycosidique du galactosyle donneur **2** et du glucosyle accepteur **3** (protégé avec un groupement N-tétrachlorophthalimido)⁶⁸ a formé de façon régio- et stéréo-sélective le disaccharide **4** dans un rendement de 75%. La déprotection et l'acétylation de l'amine en position-2 de l'unité glucosyle ont été réalisés dans un rendement de 83 % et l'estérification de l'alcool libre avec une chaîne hydrophobe a été nécessaire afin de faciliter la purification via une extraction en phase solide inversée. L'azide **5** a été réduit en ammonium en présence d'hydrogène, de Pd/C et de chlorure d'hydrogène. Cette étape ne doit pas durer plus de 20 minutes parce qu'il peut y avoir des migrations d'acétates. Finalement, l'intermédiaire **6** en présence d'une base et d'un électrophile (E) approprié a permis de fonctionnaliser la position-3'. La dé-O-acétylation a été réalisée dans des conditions standards et a donné douze analogues dont le meilleur inhibiteur est le dérivé *p*-méthoxytétrafluorobenzamide **8** (schéma 1-1(b)). La structure par rayon X de **8** co-cristallisé avec la galectine-3 (PDB : 1KJR) a permis d'expliquer pourquoi les benzamides aromatiques en position-3' ont obtenu une meilleure affinité que tout autre groupe fonctionnel à cette position (figure 1-12).^{66a} La flèche bleue montre une interaction de type cation- Π entre le groupement aromatique et l'ARG144. Après une analyse exhaustive du site actif, le groupe de Nilsson⁵⁴ a remarqué la présence d'une autre ARG en position 186. La formation d'un benzamide de symétrie- C_2 a permis de profiter d'une double interaction de type cation- Π , avec deux arginines et a donné des analogues possédant une constante d'affinité de l'ordre du nanomolaire. La figure 1-13 montre le meilleur inhibiteur de cette série d'analogues, où le dérivé bis-*p*-nitrobenzamide **9** possède un K_d de 33 nM. La formation de cette dernière série d'analogues a montré l'importance et la sous-utilisation des interactions de type cations- Π pour la conception de médicaments.



Figure 1-12 Structure cristalline de **8** montrant l'interaction de type cation- π avec l'ARG144 de la galectine-3.

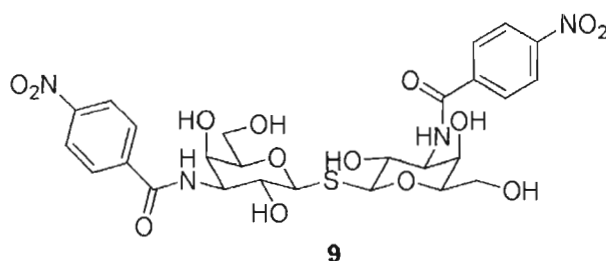


Figure 1-13 Benzamide C_2 symétrique possédant un K_d de 33 nM pour la galectine-3 profitant d'une double interaction de type cation- π avec ARG144 et ARG186.

Dans le but de concevoir des analogues possédant une augmentation de l'affinité et de la spécificité, le schéma 1-2 résume les chemins de synthèses pour l'obtention des meilleurs inhibiteurs développés par le groupe de Nilsson.^{66b-e} Dans le schéma 1-2(a) la synthèse^{66b} débute avec le thiohémiacétal **10**⁶⁹ qui a réagi avec la 2,4,6-collidine et le 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzène dans l'acétonitrile pour donner l'aryle *S*-galactoside **11** et une quantité non-négligeable de l'espèce disubstituée. La deuxième réaction de type S_NAr avec la benzylamine et la dé-*O*-acétylation en

condition standard a donné l'aryle *S*-galactoside déprotégé. Le composé **12** est le meilleur inhibiteur d'une librairie de 13 analogues possédant un K_d de 0.77 mM pour la galectine-3. Le schéma 1-2(b) présente la synthèse d'un galactosyle substitué d'un triazole en position-3'.^{66c} La synthèse commence avec l'azoture **2** (schéma 1-1(a)) qui a été soumis aux conditions de Sharpless pour donner **13** sous la forme d'un seul régioisomère (1,2,3-triazole substitué en position-1,4, cette réaction sera montrée en détails, plus loin dans l'introduction). La formation d'un amide avec l'ester et la dé-*O*-acétylation en condition standard a donné l'amide **14** qui possède un K_d de 107 μ M pour la galectine-3. Le composé **14** est le meilleur inhibiteur d'une série de 15 analogues. Par la suite, la synthèse de *O*-galactosyle aldoxime a été effectuée dans le but de concevoir des glycomimétiques qui miment l'un des ligands naturels, LacNAc (schéma 1-2(c)).^{66d} Le *O*- β -D-galactopyranosyle hydroxylamine **15**⁷⁰ a réagi avec différents aldéhydes pour former une librairie de 51 composés où l'indole **16** s'est avéré avoir la meilleure affinité pour la galectine-3 (330 μ M). L'avantage de cette méthode a été l'utilisation de saccharides non protégés. La dernière série d'analogues (schéma 1-2(d)) consiste en la formation de thiourée en position-3'.^{66e} La synthèse débute avec l'intermédiaire **4** (schéma 1-1(a)) qui en présence d'éthanediamine et d'anhydride acétique a formé l'amine acétylé en position-2 (**17**). L'azoture **17** a été réduit en présence d'hydrogène et de Pd/C, puis, réaction *in situ* avec le thiophosgène pour former l'isothiocyanate **18** correspondant. Une librairie de 13 différents analogues a été construite et le thiouré substitué du benzylamine (**19**) a donné les meilleurs résultats d'inhibition avec un K_d de 15 μ M.

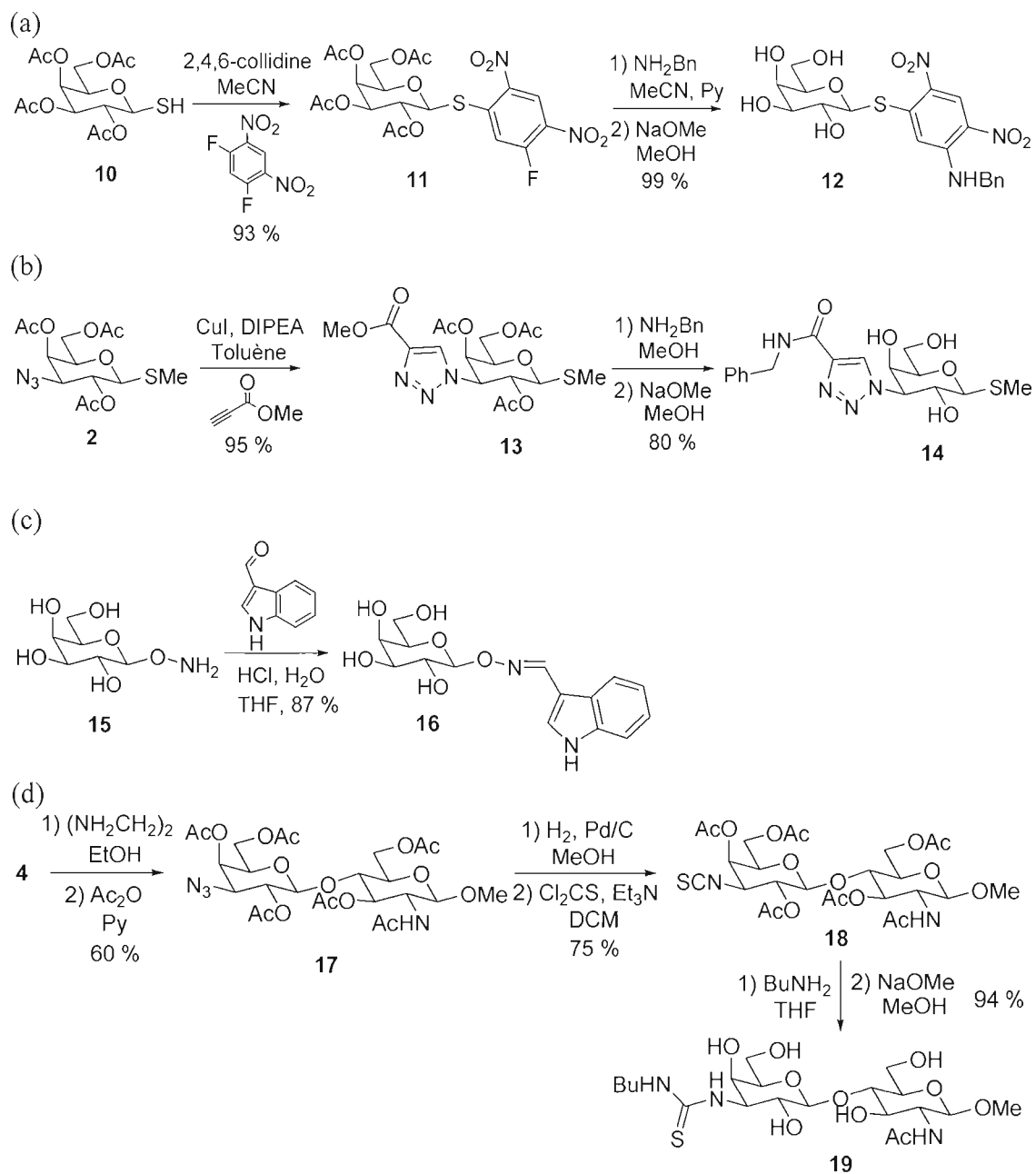


Schéma 1-2 Chemin de synthèse conduisant à quatre différentes séries d'analogues où les composés **12**, **14**, **16** et **19** sont les meilleurs inhibiteurs de chaque librairie. (a) Synthèse de thiogalactosides; (b) synthèse de triazoles en position-3'; (c) synthèse d'aldoximes anomériques; (d) synthèse de thiourées en position-3'.

L'information que l'on peut tirer de ces séries est que les inhibiteurs disaccharidiques ont de meilleures affinités pour la galectine-3 que les inhibiteurs monosaccharidiques. Ceux-ci ne sont pourtant pas de bons candidats pour le développement d'un agent thérapeutique, puisqu'ils sont trop hydrophiles.

Le groupe de Pieters⁷¹ a aussi fait un inhibiteur de la galectine-3 possédant un thiazole anomérique. La synthèse de cet analogue est montrée dans le schéma 1-3.⁷² Le méthyl 3-iodobenzoate **20** a été alkylé dans une réaction de type Sonogashira avec la propargylamine, préalablement protégée avec un groupement Boc. La déprotection de l'amine **21** a donné l'amine libre **22** qui a réagi avec l'isothiocyanate **24**. Celui-ci provient de la réduction de l'azoture **23** en amine qui a réagi ensuite avec le thiophosgène. La thiourée **25** formée en présence d'une base se retrouve sous la forme cyclisée thiazole après un traitement acide. La déprotection des alcools s'effectue en milieu basique pour former le thiazole anomérique **26**.

Les groupes de Nilsson et Pieters ont fait des glycomimétiques possédant des modifications en position anomérique et en position-3'. Antérieurement, le groupe de Roy a synthétisé des inhibiteurs multivalents.⁶⁵ Parmi une petite librairie de 7 composés, le glycocluster C_3 -symétrique s'est avéré avoir une meilleure inhibition pour la galectine-3, avec un IC_{50} de 30 μ M. Sa synthèse est montrée dans le schéma 1-4. Par simple couplage de type Sonogashira entre le lactoside propargylé **27** et le triiodobenzène **28**, il a été possible de synthétiser le glycocluster C_3 -symétrique **29** après dé-*O*-acétylation dans des conditions standards. Le groupe de Roy a été le premier à démontrer une sélectivité d'inhibition sans modifier la structure intrinsèque du glycoside. Puisque la galectine-3 est multivalente, il est possible d'augmenter l'affinité en synthétisant des inhibiteurs multivalents.

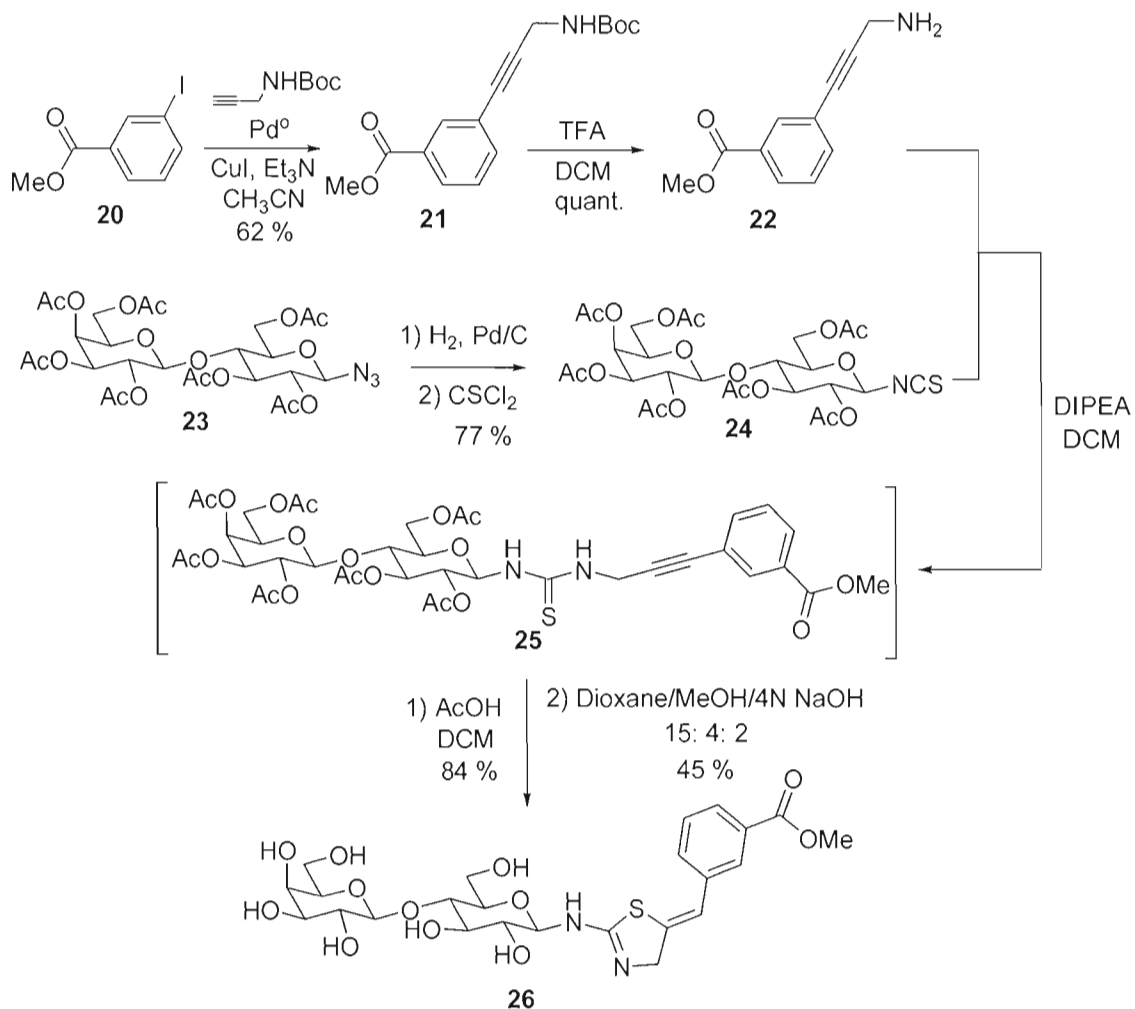


Schéma 1-3 Synthèse d'un inhibiteur de la galectine-3 possédant un IC_{50} de 21 μM pour la galectine-3.⁷¹

Avant de faire des analogues de glycomimétiques multivalents, il serait approprié de faire la synthèse d'un inhibiteur monovalent ayant une grande affinité pour la galectine-3. Ainsi, mes objectifs de recherche ont été la synthèse de glycomimétiques inhibiteurs sélectifs de la galectine-3. Pour ce faire, nous avons décidé de combiner structuralement deux très bons inhibiteurs de cette galectine : le benzamide de Nilsson⁵³ et le thiazole de Pieters.⁷¹ De cette façon, nous espérons

combiner les effets bénéfiques de ces deux composés. Le schéma 1-5 montre l'analyse rétrosynthétique de l'inhibiteur hybride.

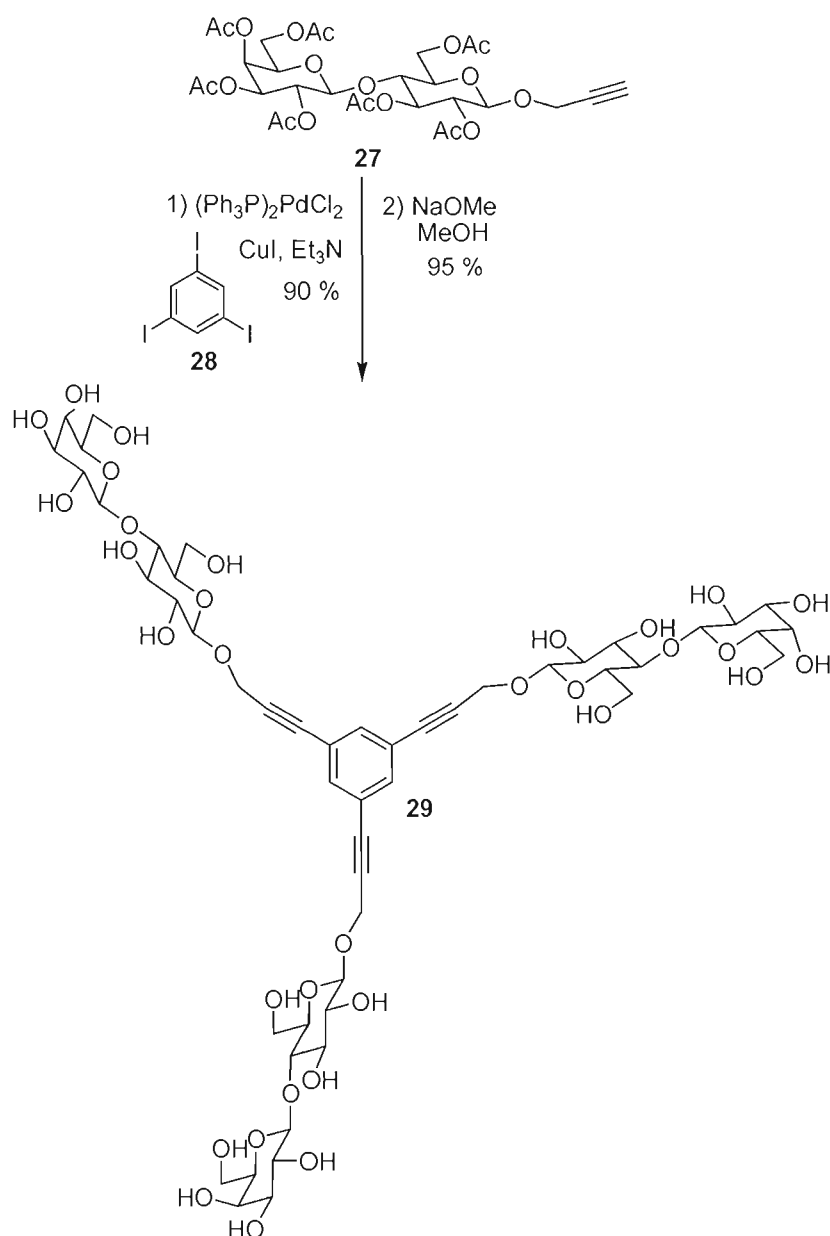


Schéma 1-4 Synthèse d'un glycocluster C₃-symétrique trivalent possédant un IC₅₀ de 30.8 μM pour la galectine-3.

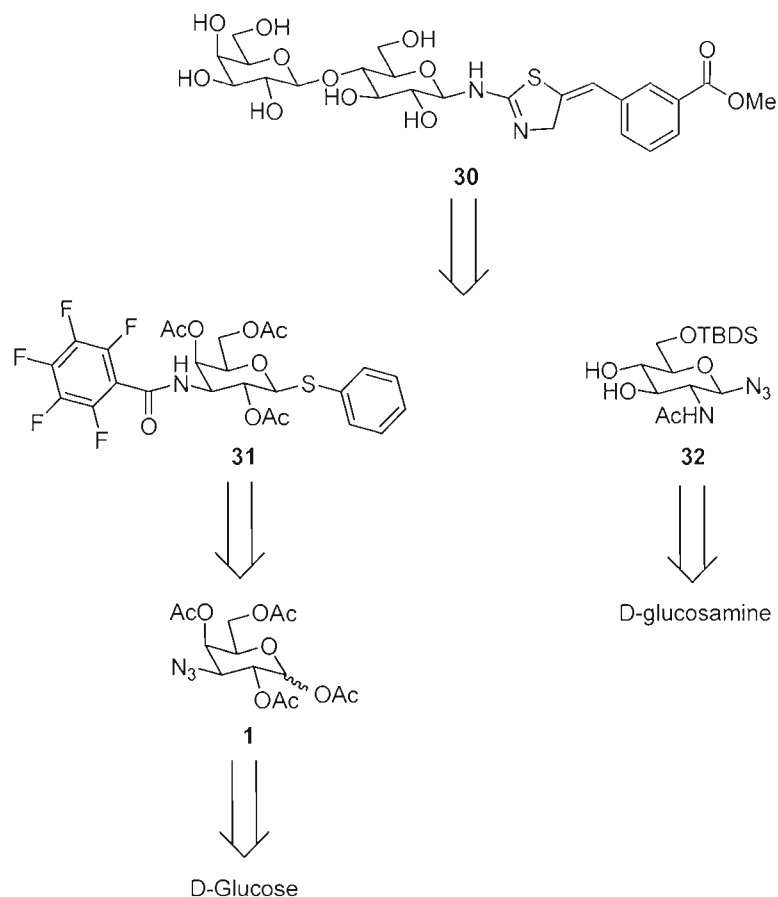


Schéma 1-5 Analyse rétrosynthétique de l'hybride de deux bons inhibiteurs.

L'hybride **30** provient de la condensation du galactosyle donneur **31** et du glucosyle accepteur **32**. L'amide de l'unité galactoside **31** provient de l'azoture en position-3 du galactose protégé **1** et cet intermédiaire est synthétisé à partir du D-glucose. L'unité glucosidique **32** provient de la D-glucosamine en quelques étapes. La synthèse du galactosyle accepteur **31** sera premièrement discutée, ensuite suivra la synthèse du glucosyle donneur **32**.

L'un des intermédiaires du benzamide **31** est l'azoture en position-3 qui est connu et décrit par le groupe de Hingsaul.⁶⁷ Nous avons fait certaines modifications à

cette séquence pour la synthèse de l'intermédiaire **1** (schéma 1-6). Le D-glucose en présence d'acide sulfurique et d'acétone a formé le diacétone- α -D-glucose **33** sous la forme furanoside dans un rendement de 38 %.⁷³ Le rendement semble faible, mais il y a formation inévitable du produit cinétique : le 4,6-*O*-isopropylidène-D-glucopyranose et cette réaction s'effectue très bien en grande quantité. L'oxydation de l'alcool secondaire du diacétonide **33** a été effectuée avec le PCC dans le DCM anhydre dans un rendement de 85 %. L'acétone **34** en présence d'une base et d'anhydride acétique a formé l'ester d'énol **35**. L'hydrogénation catalytique de **35** permet d'inverser les deux centres stéréogéniques en C3 et C4 comparativement à **33**. Une étude nOe a été nécessaire pour prouver l'inversion de configuration (figure 1-14). En ciblant l'hydrogène en C3 (-100%), il a été possible d'obtenir des signaux pour les protons en C4 (7.3%), en C2 (5.6%) et en C1 (0.9%). Cette analyse prouve que ces quatre protons sont sur le même côté du cycle. La dé-*O*-acétylation de l'alcool protégé **36** en condition standard a formé l'alcool secondaire libre en C3 (**37**) dans un rendement quantitatif. La formation d'un groupe partant avec l'anhydride triflique a permis la substitution nucléophile de type S_N2 avec l'azoture de sodium pour l'obtention de l'azide au C3 avec la bonne stéréochimie. La présence de l'azide **38** a été vérifiée en infra-rouge avec l'apparition d'une bande à 2106 cm⁻¹. Le passage de la forme furanose à la forme pyranose s'est fait en milieux acide et l'acétylation *in situ* a donné le galactoside protégé **1** dans un mélange d'anomères 1 : 1 (α : β). L'installation du thiobenzyle donne un rendement de 22 % lorsque la réaction de glycosylation via catalyse par transfert de phase est utilisée (synthèse de l'halogénogalactoside avec l'acide bromhydrique dans l'acide acétique et réaction de CTP avec le benzénethiole). L'alternative a été l'utilisation d'un acide de Lewis et du benzénethiole avec la formation d'un seul anomère (**39**) via l'assistance anchimérique. La formation du benzamide en position-3 a été réussie en réduisant l'azoture **39** en présence d'acide chlorhydrique pour la formation de l'ammonium (cette réaction ne doit pas durer plus de 20 minutes, parce que des migrations

d'acétates peuvent survenir). Lorsque le mélange a été séché sous pression réduite (le chauffage du mélange durant le processus provoque la migration de groupes acétates) l'ammonium a réagit avec le chlorure d'acyle en milieu basique pour donner le galactosyle donneur **31**.

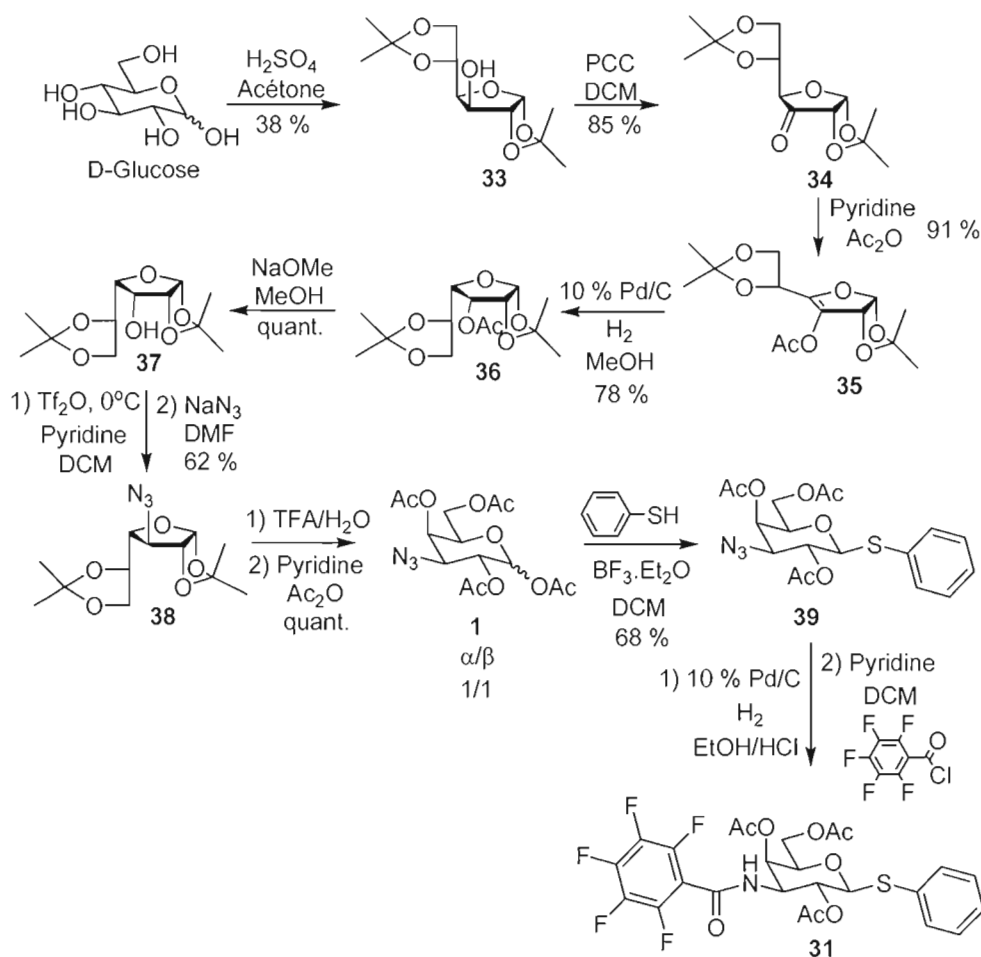


Schéma 1-6 Synthèse du galactosyle donneur **31**.

La synthèse du glycosyle accepteur (schéma 1-7) débute avec la D-glucosamine qui a été mise en présence du chlorure d'acétyle pour donner le chloroglucosamine acétylé dans un ratio de 10 : 1 (α : β).⁷⁵ Le composé **40** a été traité

avec l'azoture de sodium sous des conditions de CTP pour donner l'azido N-acétylglucosamine **41** (l'anomère α a été séparé par chromatographie sur silice). La dé-*O*-acétylation s'est faite dans des conditions standards (1M méthylate de sodium dans le méthanol) et la formation sélective de l'éther de silyle en position-6 s'est faite avec près de un équivalent de TBDPSCI, permettant la protection de l'alcool le moins encombré (**32**).

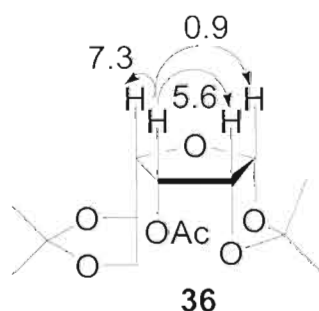


Figure 1-14 Étude nOe du composé **36** prouvant l'inversion de configuration au C3 et C4.

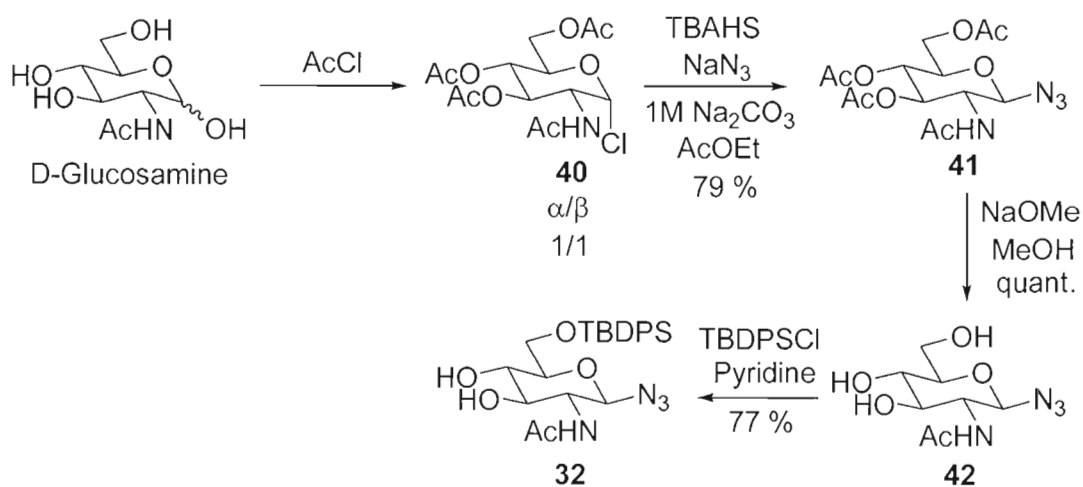


Schéma 1-7 Synthèse du glucosyle accepteur **32**.

La formation du disaccharide à partir du galactosyle donneur **31** et de la N-acétylglucosamine accepteur **32** est présentée dans le schéma 1-8. L'utilisation de N-iodosuccinimide et de l'acide trifluorométhanesulfonique a donné les meilleurs résultats pour la formation de **43**.⁷⁵ Mon travail c'est arrêté à cette étape et il ne reste que l'hydrogénation catalytique de l'azoture anomérique, réaction avec le thiophosgène, cyclization et déprotection des alcools pour donner l'hybride **30**. L'aminothiazoline anomérique synthétisé sera en équilibre avec sa forme tautomère. Le schéma 1-9 présente l'équilibre entre les deux formes tautomères d'un aminothiazoline. Probablement que l'une des deux formes tautomériques a une plus grande affinité avec la galectine-3 et il serait difficile de déterminer laquelle. En plus d'un chemin de synthèse relativement long pour obtenir un mélange de tautomères, le choix de faire d'autres analogues (**45**) (schéma 1-8) semble être plus approprié. Pour éviter la formation d'un mélange de produits, la synthèse de triazoles anomériques **45** à partir de l'azoture **43** permet d'obtenir un hétérocycle analogue du thiazole. Puisque les synthèses des analogues ne sont pas terminées, il a été impossible de les inclure dans ce mémoire.

Les prochains travaux de recherche présentés constituent le corps de ce mémoire; une brève présentation des manuscrits ainsi que les stratégies de synthèses utilisées.

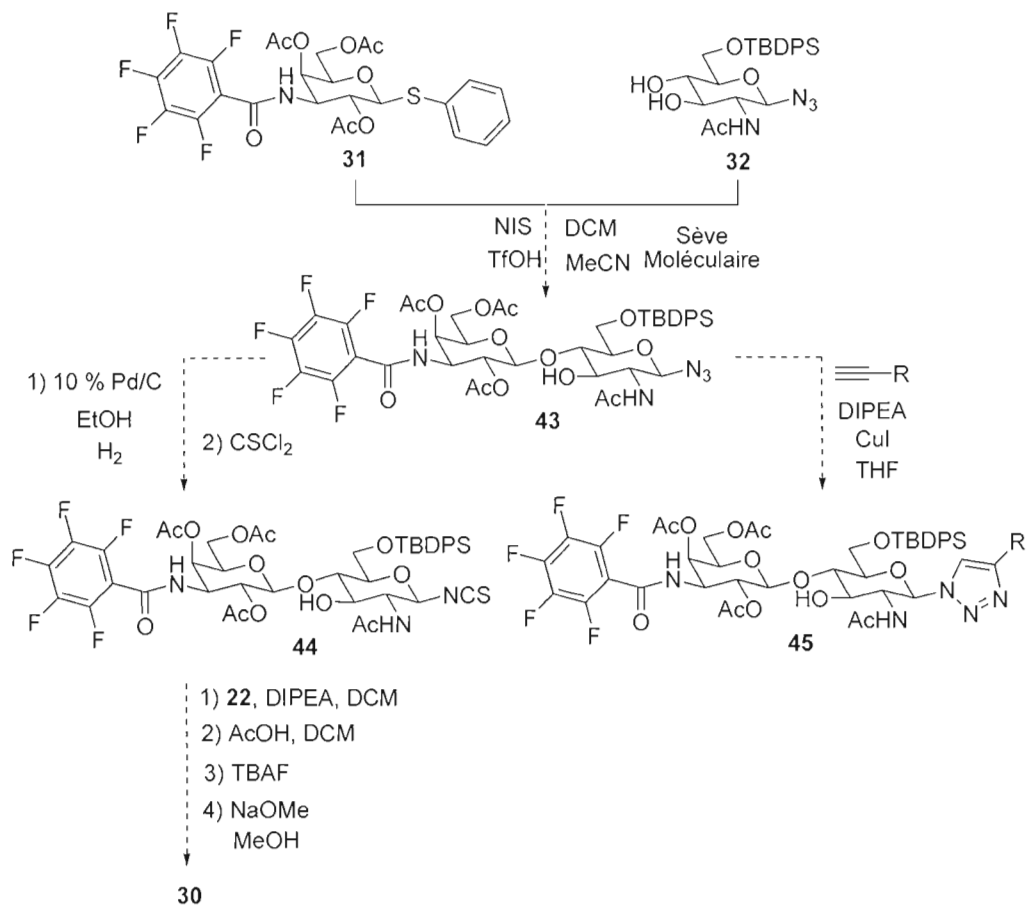


Schéma 1-8 Suite de la synthèse de l'hybride 30 et synthèse d'analogues triazoles 45.



Schéma 1-9 Les deux formes tautomères d'un aminothiazoline.

Toutes les procédures et données spectrales des composés 32-39 et 41 sont présentées en annexe.

Le manuscrit 2.1 décrit la synthèse d'aryl *O*- et *S*-galactopyranosides et lactopyranosides (chapitre 2, section 1). Ma contribution à cette recherche a été la synthèse de tous les inhibiteurs des galectines, la rédaction du manuscrit, ainsi que le calcul des densités électroniques en O-3. La méthode utilisée est une réaction catalysée par transfert de phase (CTP) (développée dans notre laboratoire)⁷⁶ et permet d'obtenir des glycomimétiques d'anomères β , accomplie dans un milieu légèrement basique, en condition non-anhydre, à température de la pièce, avec un temps de réaction inférieur à trois heures. La figure 1-15 montre les possibilités de synthèses de différentes aglycones lors de l'utilisation d'une réaction de glycosylation CTP. La synthèse de groupements aryles en position anomérique permet d'augmenter la lipophilie et la perméabilité de nos molécules, ce qui est favorable pour le développement d'un médicament de type saccharidique. Les thioglycosides synthétisés ont aussi permis de faire la synthèse de sulfones anomériques.

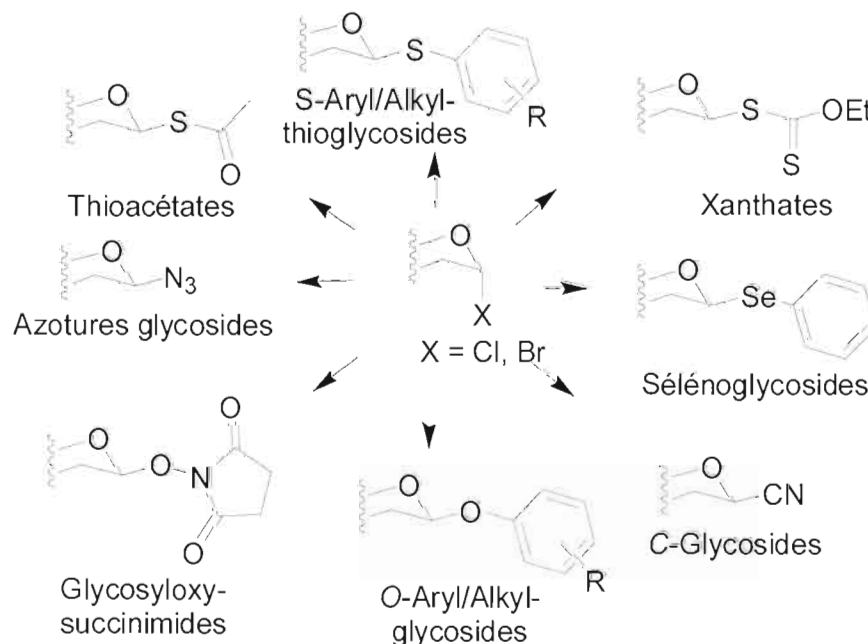


Figure 1-15 Possibilité de synthèse lors de l'utilisation de la réaction de glycosylation CTP.

Le schéma 1-10(a) montre la voie générale de synthèse d'une petite librairie d'inhibiteurs synthétiques. Les halogénures de glycosyles **46** et **47** ont été soumis aux conditions de glycosylation CTP, avec une série de thiophénols et phénols substitués et ont donné exclusivement les *O*- et *S*-glycosides- β **48** et **49** via une réaction de type S_N2 (voir section 2.1.2, pour plus de détails à propos de R_3). La dé-*O*-acétylation avec une quantité catalytique de méthylate de sodium dans le méthanol a donné les glycosides déprotégés **50** et **51** correspondant, prêt à être évalués avec les galectines, en seulement deux étapes. Par la suite, les thioglycosides **48** et **49** ont pu être oxydés pour la formation des sulfones anomériques **52** et **53** qui ont pu être évaluées après déprotection des alcools, en conditions standards (1M méthoxide de sodium dans le méthanol) (**54** et **55**). Les composés synthétisés ont été testés avec quatre différentes galectines (seules la un et la trois ont donné des résultats positifs) par notre collaboratrice, Dr. Sato (de l'université Laval). La méthode utilisée pour les essais d'héماغlutinations est décrite à la référence 77. Le meilleur composé (**56**) est montré dans le schéma 1-10(b) et possède une propriété d'inhibition de 40 μ M. Les résultats obtenus ont permis de montrer qu'il existe une corrélation directe entre la propriété d'inhibition (de la galectine-1) et la densité électronique des inhibiteurs en position-O3. Puisque l'aglycone des inhibiteurs synthétisés se retrouve à l'extérieur du site actif (figure 1-16), la sélectivité d'inhibition doit provenir d'un autre effet qu'une interaction directe. Comme montré précédemment, O3 est responsable des liens hydrogènes directs avec la galectine-1. En modifiant le groupement en position anomérique, on modifie par le fait même la densité électronique en O3 et favorise ainsi une meilleure interaction avec les résidus Arg48 et Glu71. Ce phénomène est peut-être la clé pour obtenir une inhibition sélective de la galectine-1 par rapport à d'autres galectines. Il est important de mentionner que certains thioglycosides ont déjà été testés sur la galectine-1 autrefois appelée galapine.⁷⁸

(a)

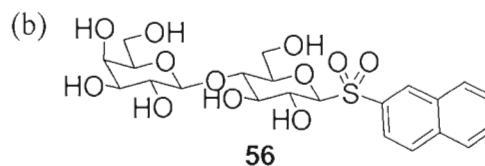
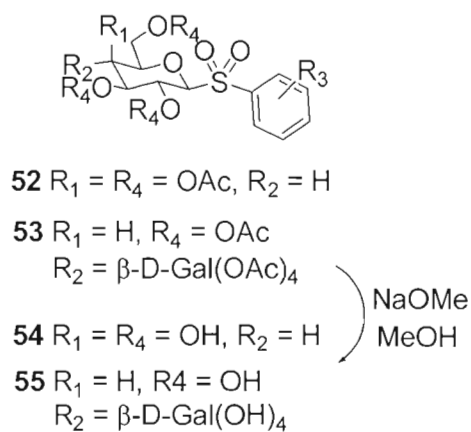
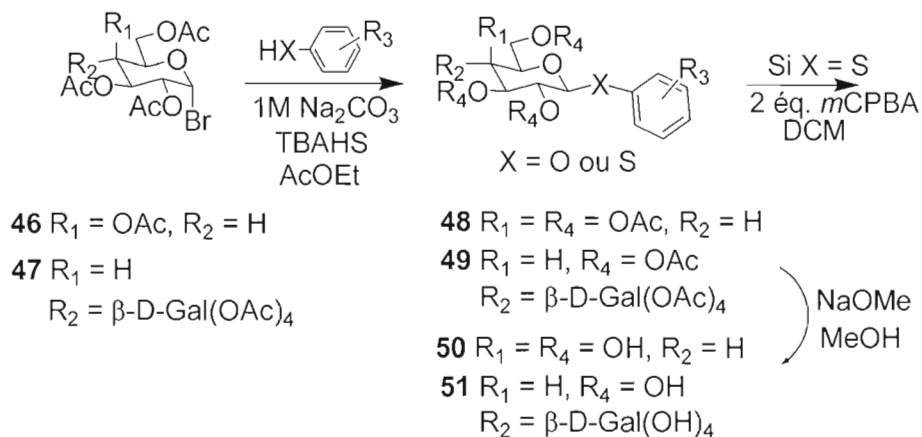


Schéma 1-10 (a) Synthèse générale des *O*- et *S*-aryles glycosides; (b) meilleur inhibiteur (**56**) obtenu de la librairie.

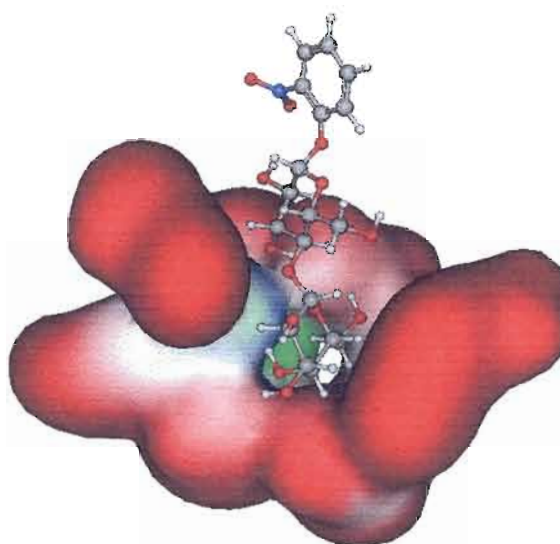


Figure 1-16 Modélisation moléculaire de **6f** (voir manuscrit en section 2.2) montrant le groupe *o*-nitrophényle du dérivé lactoside sortant du site actif de la galectine-3. En rouge on voit les régions hydrophiles et en bleu les régions hydrophobes.

Le manuscrit 2.2 décrit la synthèse de dérivés triazoles et isoxazoles dans le but de concevoir des glycomimétiques résistants à l'oxydation, la réduction ou l'hydrolyse en milieu physiologique.⁷⁹ Mon rôle dans la recherche a été la synthèse de plusieurs dérivés triazoles et isoxazoles (**17-20**, voir manuscrit 2.2.2), ainsi que l'écriture de la publication. Des alcynes terminaux ou des oxydes de nitriles possédant des glycosides ont été unis régiospécifiquement pour former des hétérocycles non naturels. Pendant les dernières années plusieurs recherches ont été effectuées sur la synthèse des 1,2,3-triazoles substitués en position-1,4. Sharpless⁸⁰ a résolu le problème de la régiosélectivité lorsque la réaction a été catalysée par une source de cuivre(I), comme montré en schéma 1-11. L'alcyne terminal **57** complexe avec le cuivre(I) (**A**), augmentant par le fait même l'acidité du proton terminal, ce qui permet de former l'équilibre **B**. L'azoture **58** attaque l'électrophile de cuivre montré en **C** et forme l'état de transition **D** qui se réarrange directement en l'intermédiaire **E**. La formation du triazole **59**, à l'aide de la base protonée, permet la reformation du

cuivre(I) catalytique. Les méthodes utilisées pour la synthèse des isoxazoles sont décrites dans la référence 81. Les analogues glycosidiques synthétisés possédaient des hétérocycles à différentes positions dans le but de découvrir un « lead » pour la synthèse d'une deuxième génération d'analogues. Parmi tous les analogues synthétisés, le composé trivalent **62** (schéma 1-12) a donné les meilleurs résultats. Ce composé est la deuxième génération d'analogues synthétisés précédemment par notre laboratoire.⁶⁵ Les « clusters » possédant un centre de symétrie- C_3 ont donné les meilleurs résultats, les synthèses et évaluations avec les galectines sont décrites dans la section 2.2.2.

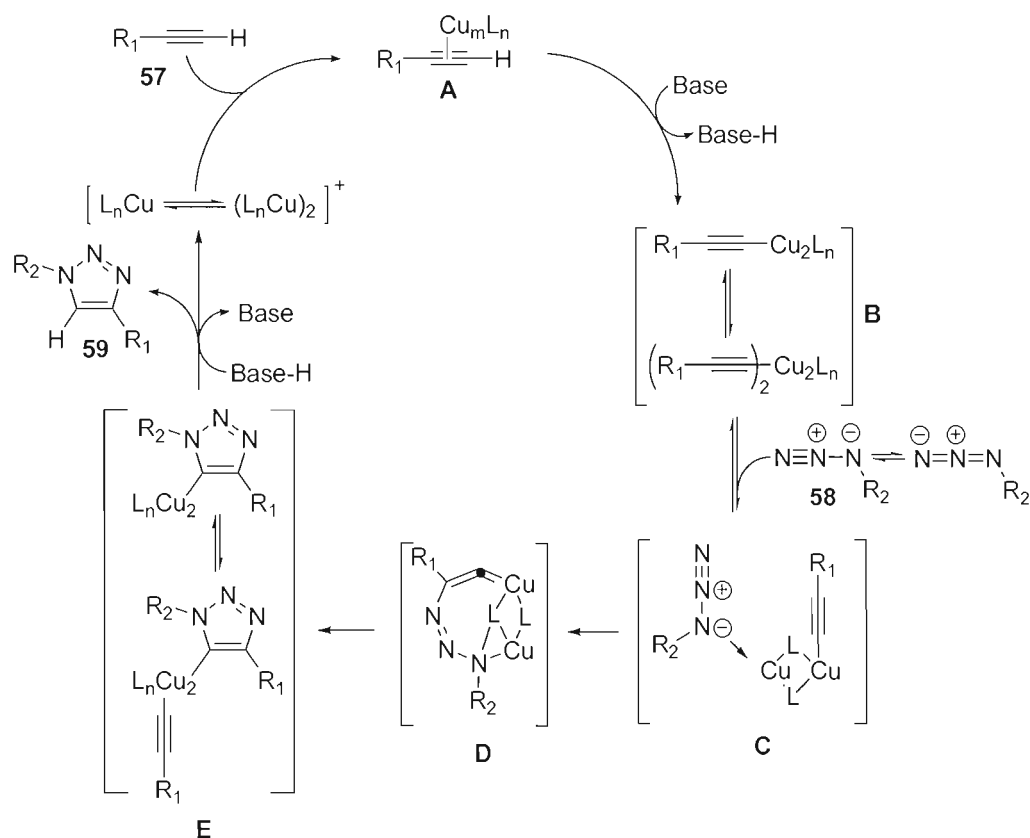


Schéma 1-11 Mécanisme de la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire pour la formation régiosélective d'un triazole.⁸²

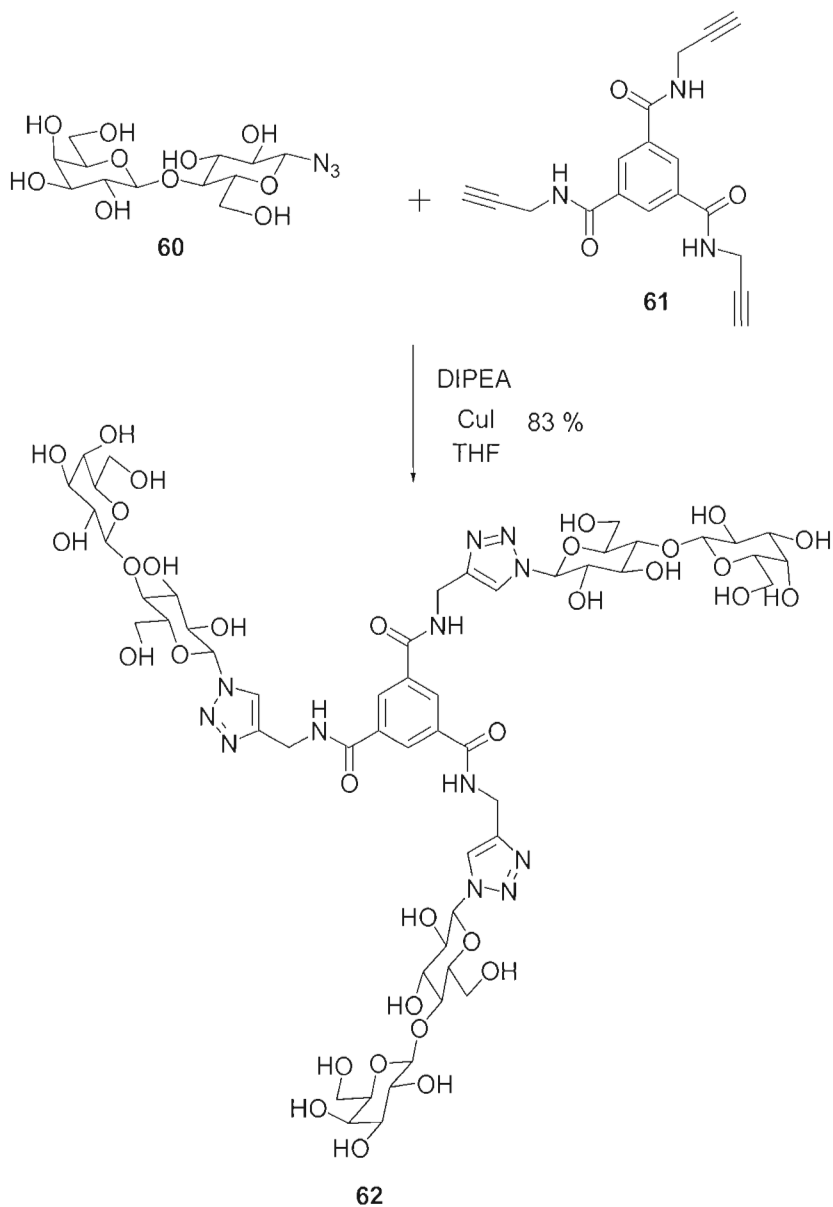


Schéma 1-12 Synthèse du glycocluster C_3 -symétrique possédant une propriété d'inhibition de 20 μM et 250 μM pour les galectines-1 et -3, respectivement.

Les travaux présentés dans le manuscrit 2.3 ont été publiés dans la prestigieuse série ACS.^{64d} Cette recherche ne portait pas sur l'inhibition sélective des galectines mais bien de la *Concanavalin A* (Con A), une protéine ayant un domaine

de reconnaissance pour le mannose. Le but intrinsèque de la recherche est l'étude de l'interaction d'un ligand avec une lectine. Il est donc pertinent de mentionner les efforts entrepris pour l'inhibition de Con A puisqu'ils peuvent être appliqués à d'autres protéines ou lectines. Mon rôle dans la recherche consistait à faire la synthèse de « clusters » de mannoside et de vérifier l'effet, la rigidité et l'orientation des espaceurs. La synthèse débute avec l'acétobromomannose **63** qui a été converti en α -*S*-mannoside propargylé **64** dans des conditions standards (schéma 1-13).⁸³ Malgré le fait que le réactif de Grubb soit réputé pour être impliqué dans des réactions de types ène-ynes,⁸⁴ à notre surprise, l'alcyne **64** a réagi 3 fois consécutivement avec lui-même pour donner, avec un bon rendement, un mélange de régioisomères (9 : 1), dont **65** est le produit majoritaire.⁸⁵

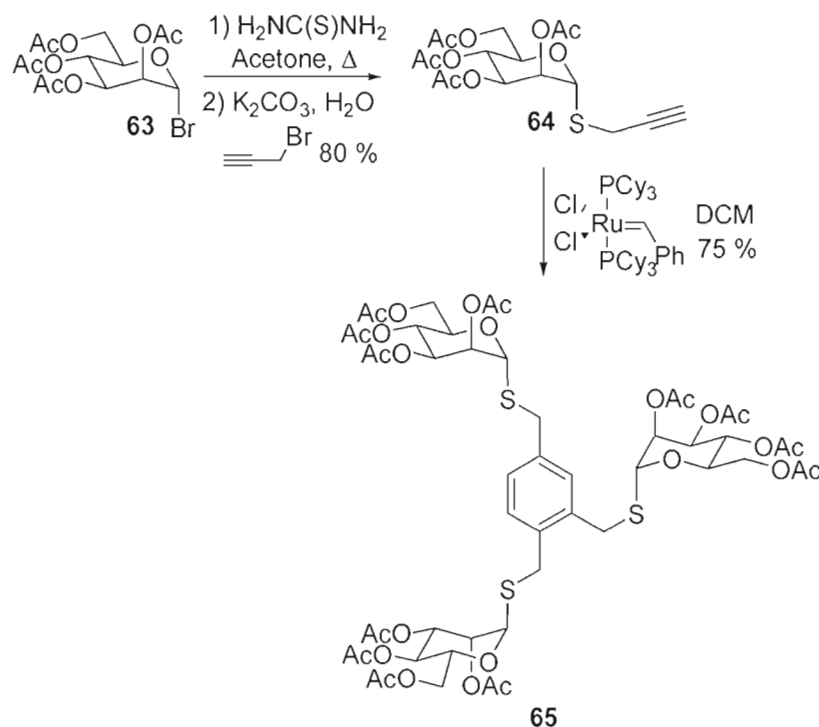


Schéma 1-13 Synthèse d'un « cluster » trivalent, en une seule étape, catalysé par le réactif de Grubbs.

Cette réaction est le fruit d'une cyclotrimérisation d'alcynes $[2+2+2]$ qui est plus connu lorsque le catalyseur est à base de cobalt ($\text{Co}_2(\text{CO})_8$). Le mécanisme de cette réaction est présenté dans le Schéma 1-14. Deux unités alcyamiques coordonnent avec le métal et couplent (A) pour donner un métallacyclopentadiène (B). Il y a insertion ou addition d'une autre unité alcyne au métallacycle pour donner les intermédiaires C ou D dépendamment de la position de la triple liaison. Le cycle benzénique se forme par l'élimination réductrice du métal pour donner E et F respectivement.

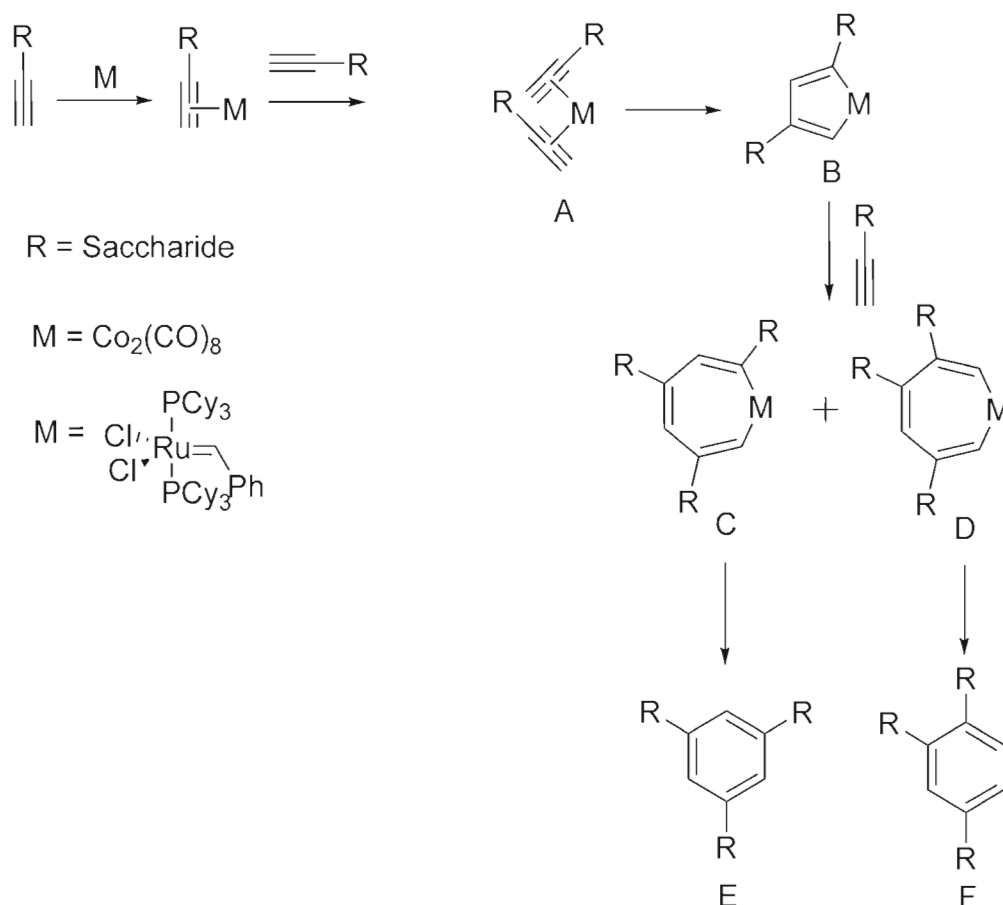


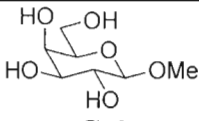
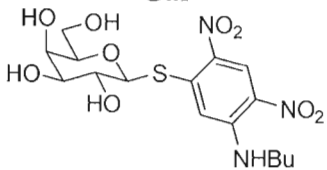
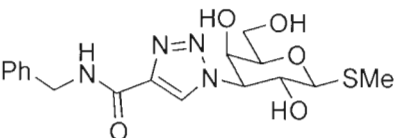
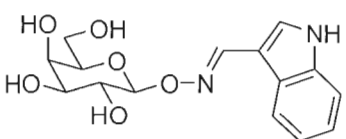
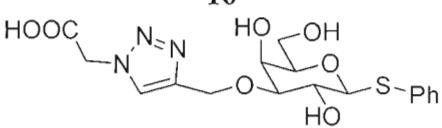
Schéma 1-14. Mécanisme de la réaction de cyclotrimérisation.⁸⁶

Les derniers résultats de recherche sont présentés dans la section 4 du chapitre 2 et constituent le premier modèle QSAR des inhibiteurs de la galectine-3 basé à partir de la modélisation moléculaire du CRD. Mon rôle dans la recherche a été une revue exhaustive de la littérature de tous les inhibiteurs connus de la galectine-3. La construction d'un modèle 2D et la participation aux conclusions générales de l'article ont permis d'obtenir des résultats décrits en section 2.4.2. Des méthodes numériques quantitatives ont été utilisées, telles que PLS et ANN et comparées au modèle QSAR pour établir une corrélation entre les propriétés moléculaires et l'affinité (K_d). La validation du modèle de prédiction a été construite à partir d'une base de données de 136 composés. La structure moléculaire et l'affinité d'inhibition (K_d) ont été obtenues à partir de la littérature. Mon rôle dans la recherche consistait en une revue exhaustive de la littérature de tous les composés ayant servi d'inhibiteurs de la galectine-3 lesquels ont été répertoriés selon leurs structures. L'analyse de tous les composés répertoriés a permis de choisir certains descripteurs. Les descripteurs moléculaires ont été sélectionnés avec l'approche PLS de contingence, ANN, PCA et GA pour la meilleure prédiction des affinités d'inhibitions de la galectine-3. Finalement, 56, 31 et 35 descripteurs ont été obtenus avec PLS, PCA et ANN respectivement. Même si le nombre de descripteurs paraît élevé, il ne s'agit en fait que de 6 descripteurs dirigés dans différentes positions.

L'étude réalisée suggère que les types PEOE et FF sont d'importants descripteurs qui sont reliés directement à la distribution de la charge en relation avec l'énergie enthalpique et les interactions hydrophobe. Ces éléments devraient être tenus en compte pour le développement de nouveaux inhibiteurs de la galectine-3. Les interactions non-covalentes telles que lipophile et la structure de l'inhibiteur sont des points importants pour l'obtention d'un inhibiteur sélectif de la galectine-3.

Pour terminer la partie introductive, il serait approprié de récapituler les meilleurs inhibiteurs (tableau 1-5, 1-6 et 1-7) de la galectine-3 associés avec leurs propriétés d'inhibitions et leurs affinités relatives. Puisque les différents groupes de recherche utilisent différents tests biologiques, la seule façon de comparer les résultats est de se baser sur l'affinité relative des inhibiteurs synthétiques comparés aux substrats naturels (galactose ou N-acétyllactosamine). Le tableau 1-5 présente les meilleurs monosaccharides inhibiteurs de la galectine-3. Tous les composés (**12**, **14**, **16** et **65**) possèdent une ou des structures aromatiques en position anomérique ou en position-3'. La présence d'un triazole en position-3' (**14** et **66**) semble avoir un effet bénéfique avec une affinité relative de 41 et 10 respectivement, comparé au galactose. Le tableau 1-6, présente les meilleurs disaccharides inhibiteurs de la galectine-3. La plupart des inhibiteurs (**8**, **9**, **26**, **56**) possèdent des structures aromatiques et le dimère **9** s'est avéré être le plus efficace avec une propriété d'inhibition de 33 nM et avec une affinité relative de 2090 comparé au LacNAc. Le tableau 1-7 récapitule les meilleurs inhibiteurs multivalents de la galectine-3. Les deux inhibiteurs de symétrie- C_3 **29** et **62** ont eu chacun une propriété d'inhibition de 31 et 250 mM avec une affinité relative de 23 et 3 respectivement. Ces résultats illustrent la possibilité d'utiliser des analogues multivalents comme sonde moléculaire efficace et sélective.

Tableau 1-5 Récapitulation des meilleurs inhibiteurs monosaccharidiques de la galectine-3 associés avec leur pouvoir inhibiteur.

Struture / Numéro	Propriété d'inhibition (μM)	Affinité relative ^a	Auteur ^{réf.} Année
 Gal	5 ^b	1	Roy ⁶⁵ 2003
 12	750 000 ^c	na ^e	Nilsson ^{66b} 2005
 14	107 ^c	41	Nilsson ^{66c} 2005
 16	180 ^c	24	Nilsson ^{66d} 2005
 66	5 ^d	10	Roy ^f 2006

^a : **12**, **14**, **16** et **66** ont été comparés au substrat naturel galactose (Gal).

^b : IC₅₀

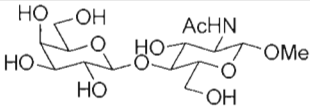
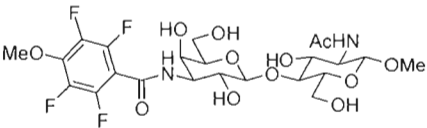
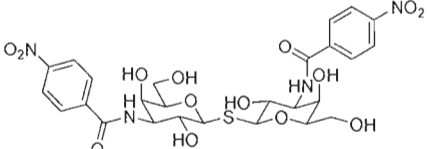
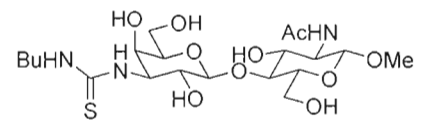
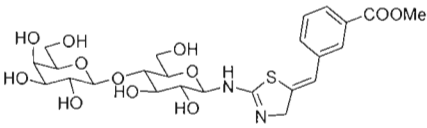
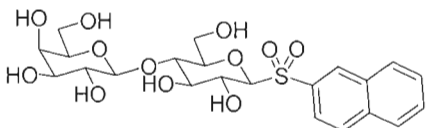
^c : K_d

^d : Propriété d'inhibition, pour plus d'information, voir manuscrit cité.

^e : na : non applicable, affinité inférieur au ligand naturel.

^f : Information retrouvée dans le chapitre 2, section 2.

Tableau 1-6 Récapitulation des meilleurs inhibiteurs disaccharidiques de la galectine-3 associés avec leur pouvoir inhibiteur.

Struture / Numéro	Propriété d'inhibition (μM)	Affinité relative ^a	Auteur ^{réf.} Année
 LacNAc	0.7 ^b	1	Roy ⁶⁵ 2003
 8	4.4 ^b	47	Nilsson ⁵³ 2002
 9	0.033 ^c	2090	Nilsson ⁵⁴ 2004
 19	15 ^c	4.5	Nilsson ^{66e} 2005
 26	21 ^b	10	Pieters ⁷¹ 2003
 56	313 ^d	3	Roy ^e 2006

^a : **8**, **9**, **19**, **26**, **29** et **56** ont été comparés au N-acethylactosamine (LacNAc).

^b : IC₅₀

^c : K_d

^d : Propriété d'inhibition pour plus d'information, voir manuscrit cité.

^e : Information retrouvée dans le chapitre 2, section 1.

Tableau 1-7 Récapitulation des meilleurs inhibiteurs multivalents de la galectine-3 associés avec leur pouvoir inhibiteur.

Struture / Numéro	Propriété d'inhibition (μM)	Affinité relative ^{a, d}	Auteur ^{Ref.} Année
<p style="text-align: center;">29</p>	31 ^b	23 (8)	Roy ⁶⁵ 2003
<p style="text-align: center;">62</p>	250 ^c	3 (1)	Roy ^e 2006

^a : **29** et **62** ont été comparés au N-acethylactosamine (LacNAc).

^b : IC₅₀

^c : Propriété d'inhibition pour plus d'information, voir manuscrit cité.

^d : Les nombres entre parenthèse représentent l'affinité relative pour chaque unité glycosidique.

^e : Information retrouvée dans le chapitre 2, section 2.

1.3 Références

- 1 Sharon, N. *Complex Carbohydrates, Their Chemistry, Biosynthesis and Function*, Addison-Wesley, Reading, MA, USA, **1975**.
- 2 (a) Hughes, R. C. *Biochimie*, **2001**, 83, 667; (b) Hirabayashi, J. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1997**, 9, 1; (c) Varki, A. *Glycobiology*, **1993**, 3, 97; (d) Karlsson, K. A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 622; (e) Perillo, N. L.; Marcus, M. E.; Baum, L. G. *J. Mol. Med.* **1998**, 76, 402.
- 3 L'image a été tirée du site internet de Wong, C.-H (Scripps Research Institute) : <http://www.scripps.edu/chem/wong/>
- 4 (a) Galili, U.; Matta, K. L. *Transplantation*, **1996**, 6, 256; (b) Galili, U. *Immunol. Today*, **1993**, 14, 480; (c) Cooper, D. K. C.; Oriol, R. *Glycosciences. Status and Perspectives*, Eds, Gabius, H.-J.; Gabius, S. Chapman & Hall, Weinheim, Germany, pp. 531, **1997**; (d) Lafferty, K. J. *Transplant. Proc.*, **1999**, 31, S-1; (e) Martin, U.; Stainhoff, G.; Kiessig, V.; Chikobava, M.; Anssar, M.; Morschheusser, T.; Lapin, B.; Haverich, A. *Transplant. Proc.*, **1999**, 31, 913; (f) Galili, U. *Immunol. Series*, **1991**, 55, 355; (g) Galili, U. *Blood Cells*, **1988**, 14, 205.
- 5 Haataja, S.; Tikkanen, K.; Nilsson, U.; Magnusson, G.; Karlsson, K.; Finne, J. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 27466.
- 6 Roy, R. in *Glycochemistry, Principles, Synthesis, and application*, Eds P.G. Wang and C. R. Bertozzi, Marcel Dekker, Inc., New York, **2001**, pp. 277.
- 7 Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, 23, 3.
- 8 (a) Liu, B.; Roy, R.; *Tetrahedron* **2001**, 57, 6909; (b) Dubber, M.; Lindhorst, T. K.; *Carbohydr. Res.* **1998**, 310, 35; (c) Lindhorst, T. K.; Kieburg, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 1953; (d) Ashton, P. R.; Boyd, S. E.; Brown, C. L.; Nepogodiev, S. A.; Meijer, E. W.; Peerlings, H. W. I.; Stoddart, J. F. *Chem. Eur. J.* **1996**, 2, 1115; (e) Vargas-Berenguel, A.; Ortega-Caballero, F.; Santoyo-Gonzalez, F.; Garcia-Lopez, J. J.; Gimmenez, J. J.; Garcia-Fientes, L.; Ortiz-Salmeron, O. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 812; (f) Sliedregt, L. A. J. M.; Rensen, P. C. N.; Rump, E. T.; van Santbrink, P. J.; Bijsterbosch, M. K.;

- Valentijn, A. R. P. M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; van Berkel, T. J. C.; Biessen, E. A. L. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 609.
- 9 (a) Roy, R. *Polym. News*, **1996**, 21, 226; (b) Roy, R.; Kim, J. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, 38, 369; (c) Meunier, S. J.; Roy, R. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 5469.
- 10 Lerrer, B.; Gilboa-Garber, N. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2001**, 32, 33.
- 11 (a) Hansen, H. C.; Haataja, S.; Finne, J.; Magnusson, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 6974; (b) Hansen, H. C.; Magnusson, G. *Carbohydr. Res.* **1998**, 307, 243.
- 12 (a) Li, X.; Yang, L.; Li, H.; Li, Q.; Cheng, T.; Cai, M.; Li, Z. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 977; (b) Andre, S.; Pieters, R. J.; Vrasidas, I.; Kaltner, H.; Kuwabara, I.; Liu, F.; Liskamp, R. M. J.; Gabius, H.-C. *ChemBioChem.* **2001**, 2, 822; (c) André, S.; Frisch, B.; Kaltner, H.; Desouza, D. L.; Schubert, F.; Gabius, H. J. *Pharmaceutical Research*, **2000**, 17, 985; (d) André, S.; Ortega, P. J. C.; Perez, A. M.; Roy, R.; Gabius, H. *Glycobiology*, **1999**, 9, 1253; (e) Aoi, K.; Itoh, K.; Okada, M. *Macromolecules*, **1995**, 28, 5391; (f) Roy, R.; Park, W. K. C.; Wu, Q.; Wang, S. N. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 4377.
- 13 (a) Zanini, D.; Roy, R. *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, 187; (b) Furuike, T.; Nishi, N.; Tokura, S.; Nishimura, S.-I. *Macromolecules*, **1995**, 28, 7241.
- 14 Roy, R. Thompson, J.; Sashiwa, H.; Das, S. K.; Tripathy, S.; Gabius, H. J. *Proceedings of Acfas Congress*, Ottawa, **1999**.
- 15 (a) Roy, R.; Baek, M. G.; Xia, Z.; Rittenhouse-Diakun, K. *Glycoconjugate J.* **1999**, 16, 853; (b) Roy, R.; Baek, M. G.; Rittenhouse-Diakun, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1809; (c) Baek, M. G.; Roy, R. *Macromol. Biosci.* **2001**, 1, 305; (d) Roy, R.; Baek, M. G. *Reviews in Molecular Biotechnology*, **2002**, 9, 291.
- 16 Tsvetkov, D. E.; Cheshev, P. E.; Tuzikov, A. V.; Pazynina, G. V.; Bovin, N. V.; Rieben, R.; Nifant'ev, N. E. *Mendeleev, Commun.* **1999**, 47.
- 17 (a) Rieben, R.; Bovin, N. V.; Korchagina, E. Y.; Oriel, R.; Nifant'ev, D.; Tsvetkov, D. E.; Doha, M. R.; Mohacsi, P. J.; Joziassé, D. H. *Glycobiology*, **2000**, 10, 141; (b) Hanessian, S.; Saavedra, O. M.; Mascitti, V.; Marterer, W.; Oehrlein, R.; Mak, C.-P. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 3267; (c) Hanessian, S.; Huynh, H. K.; Reddy, G. V.; Duthaler, R. O.; Katopodis, A.; Streiff, M. B.; Kinzy, W.; Oehrlein, R. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 3281; (d) Wang, J.; Chen, X.; Zhang, W.; Zacharek, S.; Chen, Y.; Wang, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121,

- 8174; (e) Chen, X.; Andreana, P. R.; Wang, P. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 650; (f) Li, J.; Zacharek, S.; Chen, X.; Wang, J.; Zhang, W.; Janczuk, A.; Wang, P. G. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 1549; (g) Liu, B.; Roy, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**, 773; (h) Liu, B. Roy, R. *Chem. Commun.* **2002**, 594.
- 18 (a) Kitov, P. I.; Sadowska, J. M.; Mulvey, G.; Armstrong, G. D.; Ling, H.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Bundle, D. R. *Nature*, **2000**, 403, 669; (b) Matsuoka, K.; Terabatake, M.; Esumi, Y.; Terunuma, D.; Kuzuhara, H. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 7839; (c) Dohi, H.; Nishida, Y.; Takeda, T.; Kobayashi, K. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 983.
- 19 (a) Thompson, J. P.; Schengrund, C. *Biochemical Pharmacology*, **1998**, 56, 591; (b) Thompson, J. P.; Schengrund, C. *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 837; (c) Fan, E.; Zhang, Z.; Minke, W. E.; Hou, Z.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2663; (d) Mitchell, J. P.; Roberts, K. D.; Langley, J.; Koentgen, F.; Lambert, J. N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2785.
- 20 (a) Barondes, S. H.; Cooper, D. N. W.; Gitt, M. A.; Leffler, H. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 20807; (b) Barondes, S. H.; Gastronovo, V.; Cooper, D. N. W.; Cummings, R. D.; Drickamer, K.; Feizi, T.; Gitt, M. A.; Hirabayashi, J.; Hughes, C.; Kasai, K.; Leffler, H.; Liu, F.; Lotan, R.; Mercurio, A. M.; Monsigny, M.; Pillai, S.; Poirier, F.; Raz, A.; Rigby, P. W. J.; Rini, J. M.; Wang, J. L. *Cell*. **1994**, 76, 597.
- 21 Gray, C. A.; Dunlap, K. A.; Burghardt, R. C.; Spencer, T. E. *Reproduction* **2005**, 130, 231.
- 22 Gitt, M. A.; Wiser, M. F.; Leffler, H.; Herrmann, J.; Xia, Y.-R.; Massa, S. M.; Cooper, D. N. W.; Lusi, A. J.; Barondes, S. H. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 5032.
- 23 (a) Gitt, M. A.; Colnot, C.; Poirier, F.; Nani, K. J.; Barondes, S. H.; Leffler, H. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 2954; (b) Gitt, M. A.; Xia, Y.-R.; Atchison, R. E.; Lusi, A. J.; Barondes, S. H.; Leffler, H. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 2961.
- 24 Magnaldo, T.; Fowles, D.; Darmon, M. *Differentiation*. **1998**, 63, 159.
- 25 Bassen, R.; Brichory, F.; Caulet-Maugendre, S.; Bidon, N.; Delaval, P.; Desrues, B.; Dazord, I. *Anticancer Res.* **1999**, 19, 5429.
- 26 Wada, J.; Kanwar, Y. S. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 6078.

- 27 Swaminathan, J.; Leonidas, D. D.; Savage, M. P.; Ackerman, S. J.; Acharya, K. R. *Biochemistry*, **1999**, 38, 13837.
- 28 Buck, F.; Schulze, C.; Breloer, M.; Strupat, K.; Bretting, H. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem.* **1998**, 121, 153.
- 29 Yang, R.-Y.; Hsu, D. K.; Yu, L.; Ni, J.; Liu, F.-T. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 20252.
- 30 Visegrady, B.; G.Than, N.; Kilar, F.; Sümegi, B.; N.Than, G.; Bohn, H. *Protein Engineering*, **2001**, 14, 875.
- 31 Dunphy, J. L.; Barcham, G. J.; Bischof, R. J.; Young, A. R.; Nash, A.; Meeusen, E. N. T. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 14916.
- 32 Gray, A.; Adelson, D. L.; Bazer, F. W.; Burghardt, R. C.; Meeusen, E. N. T.; Spencer, T. E. *PNAS*, **2004**, 101, 7987.
- 33 Oda, Y.; Herrmann, J.; Gitt, M. A.; Turck, C. W.; Burlingame, A. L.; Barondes, S. H.; Leffler, H. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 5929.
- 34 Cooper, D. N. W.; Barondes, S. H. *Glycobiology* **1999**, 9, 979.
- 35 (a) Sharon, N. *Trends Biochem. Sci.* **1993**, 18, 221; (b) Emsley, J.; White, H. E.; O'Hara, B. P.; Oliva, G.; Srinivasan, N.; Tickle, I. J.; Blundell, T. L. Pepys, M. B.; Wood, S. P. *Nature* **1994**, 367, 338.
- 36 Liu, F.-T.; Patterson, R. J.; Wang, J. L. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1572, 263.
- 37 Ochieng, J.; Furtak, V.; Lukyanov, P. *Glycoconjugate J.* **2004**, 19, 527.
- 38 (a) Hirabayashi, J.; Kasai, K. *Glycobiology* **1993**, 3, 297; (b) Pfeifer, K.; Haasemann, M.; Gamulin, V.; Bretting, H.; Fahrenholz, F.; Muller, W. E. *Glycobiology* **1993**, 3, 179.
- 39 Colnot, C.; Ripoche, M.-A.; Fowles, D.; Cannon, V.; Scaerou, F.; Cooper, D. N. W.; Poirier, F. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1997**, 9, 31.
- 40 Chiarotti, L.; Salvatore, P.; Frunzio, R.; Bruni, C. B. *Glycoconjugate J.* **2004**, 19, 441.

- 41 Bresalier, R. S.; Mazurek, N.; Stenberg, L. R.; Byrd, J.; Yunker, C. K.; Nangia-Makker, P.; Raz, A. *Gastroenterology* **1998**, 115, 287.
- 42 Yang, R.-Y.; Hsu, D. K.; Liu, F.-T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, 93, 6737.
- 43 Zou, J.; Glinsky, V. V.; Landon, L. A.; Matthews, L.; Deutscher, S. L. *Carcinogenesis* **2005**, 26, 309.
- 44 Pour une bonne revision sur le rôle de la galectine-3 dans le système immunitaire voir (a) Sato, S.; Nieminem, J. *Glycoconjugate J.* **2004**, 19, 441; (b) Sato, S. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2002**, 14, 285; (c) Liu, F. T. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **2005**, 136, 385.
- 45 (a) Califice, S.; Castronovo, V.; Van Van Den Brule, F.; *Int. J. Oncol.* **2004**, 25, 983; (b) Nakahara, S.; Oka, N.; Raz, A. *Apoptosis* **2005**, 10, 267.
- 46 (a) Wiest, I.; Seliger, C.; Walzel, H.; Friese, K.; Jeschke, U.; *Anticancer Res.* **2005**, 25, 1575; (b) Szoke, T.; Kayser, K.; Baumhakel, J. D.; Trojan, I.; Furak, J.; Tiszlaviez, L.; Horvath, A.; Szluha, K.; Gabius, H.-J.; André, S. *Oncology* **2005**, 69, 167; (c) Battig, P.; Saudan, P.; Gunde, T.; Bachmann, M. F. *Mol. Immunol.* **2004**, 41, 9.
- 47 Pour de bonne publication sur l'apoptose cellulaire chez les galectines : (a) Hsu, D. K.; Liu, F. T. *Glycoconjugate. J.* **2004**, 19, 507; (b) Hermandes, J. D.; Baum, L. G. *Glycobiology.* **2002**, 12, 127R.
- 48 (a) Ouellet, M.; Mercier, S.; Pelletier, I.; Bounou, S.; Roy, J.; Hirabayashi, J.; Sato, S.; Tremblay, M. J. *J. Immunol.* **2005**, 174, 4120; (b) Rabinovich, G. A. *Br. J. Cancer* **2005**, 92, 1188; (c) Kato, T.; Ren, C. H.; Wada, M.; Kawanami, T.; *Curr. Drug Targets* **2005**, 6, 407.
- 49 Brewer, C. F. *Glycoconjugate. J.* **2004**, 19, 459.
- 50 (a) Hirabayashi, J.; Kasai, K. *Glycobiology.* **1993**, 3, 297; (b) Kasai, K.; Hirabayashi, J. *J. Biochem.* **1996**, 119, 1.
- 51 Gitt, M. A.; Massa, S. M.; Leffler, H.; Barondes, S. H. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 10601.
- 52 Lopez-Lucendo, M. F.; Solis, D.; André, S.; Hirabayashi, J.; Kasai, K.-i.; Kaltner, H.; Gabius, H.-J.; Romero, A. *J. Mol. Biol.* **2004**, 343, 957.

- 53 Sörme, P.; Qian, Y.; Nyholm, P.-G.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *ChemBioChem*. **2002**, 3, 183.
- 54 Cumpstey, I.; Sundin, A.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5110.
- 55 Seetharaman, J.; Kanigsberg, A.; Slaaby, R.; Leffler, H.; Barondes, S. H.; Rini, J. M. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 13047.
- 56 André, S.; Kaltner, H.; Lensch, M.; Russwurm, R.; Siebert, H.-C.; Fallsehr, C.; Tajkhorshid, E.; Heck, A. J. R.; Doeberitz, M. von K.; Gabius, H.-J.; Kopitz, J. *Int. J. Cancer* **2005**, 114, 46.
- 57 (a) Brewer, C. F. Chemtracts, *Biochem. Mol. Biol.* **1996**, 6, 165; (b) Brewer, C. F. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1997**, 9, 155.
- 58 Brewer, C. F. *Biochim. Biophys Acta*, **2002**, 1572, 255.
- 59 Morris, S.; Ahmad, N.; André, S.; Kaltner, H.; Gabius, H.-J.; Brenowitz, M.; Brewer, F. *Glycobiology*, **2004**, 14, 293.
- 60 (a) Dam, T. K.; Gabius, H.-J.; André, S.; Kaltner, H.; Lensch, M.; Brewer, C. F. *Biochemistry*, **2005**, 44, 12564; (b) Ahmad, N.; Gabius, H.-J.; André, S.; Kaltner, H.; Sabesan, S.; Roy, R.; Liu, B.; Macaluso, F.; Brewer, C. F. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 10841; (c) André, S.; Ortega, P. J.; Perez, M. A.; Roy, R.; Gabius, H.-J. *Glycobiology*, **1999**, 9, 1253.
- 61 (a) Gupta, D.; Cho, M.; Cummings, R. D.; Brewer, C. F. *Biochemistry*, 1996, 35, 15236; (b) Ahmad, N.; Gabius, H.-J.; Sabesan, S.; Oscarson, S.; Brewer, C. F. *Glycobiology*, **2004**, 14, 817.
- 62 Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637.
- 63 (a) Lee, Y.-C.; Lee, R.-T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 321; (b) Sacchettini, J. C.; Baum, L. G.; Brewer, C. F. *Biochemistry*, **2001**, 40, 3009; (c) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 555; (c) Roy, R. *Top. Curr. Chem.* **1997**, 187, 241.
- 64 (a) Roy, R. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1996**, 8, 79; (b) Roy, R. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, 15, 291; (c) Dam, T. K.; Roy, R.; Pagé, D.; Brewer, C. F. *Biochemistry* **2002**, 41, 1351; (d) Roy, R.; Trono, M. C.; Giguère, D. Effects of Linker Rigidity and Orientation of Mannoside Cluster

for Multivalent Interactions with Protein. ACS Symposium Series 896, *Glycomimetics: Modern Synthetic Methodologies* **2004**, 896, 137.

- 65 André, S.; Liu, B.; Gabius, H.-J.; Roy, R. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3909.
- 66 (a) Sörme, P.; Arnoux, P.; Kahl-Knutsson, B.; Leffler, H.; Rini, J. M. Nilsson, U. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1737; (b) Cumpstey, I.; Carlsson, S.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1922; (c) Salameh, B. A.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 3344; (d) Tejler, J.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2343; (e) Salameh, B. A.; Sundin, A.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, asap.
- 67 Lowary, T. L.; Hindsgaul, O. *Carbohydr. Res.* **1994**, 251, 33.
- 68 Ellervik, U.; Magnusson, G. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9314.
- 69 Johnston, B. D.; Pinto, B. M. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4607.
- 70 Cao, C.; Tropper, F. D.; Roy, R. *Tetrahedron* **1995**, 51, 6679.
- 71 Vrasidas, I.; André, S.; Valentini, P.; Bock, C.; Lensch, M.; Kaltner, H.; Linskamp, R. M.; Gabius, R. J.; Pieters, R. J. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 803.
- 72 Vrasidas, I.; Kemmink, J.; Linskamp, R. M. J.; Pieters, R. J. *Org. Lett.* **2002**, 4, 1807.
- 73 Reckendorf, W. M. zu *Methods Carbohydr. Chem.*, R. L. Whistler and J. N. BeMiller, Eds.; Academic Press: New York, **1972**, 6, 129-131.
- 74 Horton, D. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. VI; R. L. Whistler and J. N. BeMiller, Eds.; Academic Press: New York, **1972**, p. 282.
- 75 Gan, Z.; Cao, S.; Wu, Q.; Roy, R. *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, 18, 755.
- 76 (a) Roy, R.; Tropper, F. D.; Cao, S.; Kim, J. M. *Phase Transfer Catalyst Mechanism and Syntheses*. ACS Symposium Series. **1997**, 569, 163; (b) Carrière, D.; Meunier, S. J.; Tropper, F. D.; Cao, S.; Roy, R. *J. Mol. Catal. A : Chem.* **2000**, 154, 9; (c) Cao, S.; Meunier, S. J.; Andersson, F. O.; Letellier, M.; Roy, R.; *Tetrahedron : Asymmetry* **1994**, 5, 2303.

- 77 (a) Ouellet, M.; Mercier, S.; Pelletier, I.; Bounou, S.; Roy, J.; Hirabayashi, J.; Sato, S.; Tremblay, J. *J. Immunol.* **2005**, 174, 4120; (b) W. T. Butler, *J. Immunol.* **1963**, 90, 663.
- 78 (a) Ahmed, H.; Allen, H. J.; Sharma, A.; Matta, K. L. *Biochemistry* **1990**, 29, 5313; (b) Lee, R. T.; Ichikawa, Y.; Allen, H. J.; Lee, Y. C. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 7864.
- 79 Wamhoff, H. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; Katritzky, A. R.; Ress, C. W.; Potts, K. T. Eds.; Pergamon Oxford, **1984**, 5, pp. 669.
- 80 Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 210.
- 81 (a) Hausser, F. M.; Hu, X. *Org. Lett.* **2002**, 4, 977; (b) Itoh, K.-I.; Takahashi, S.; Ueki, T.; Sugiyama, T.; Takahashi, T.; Horiuchi, C. A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 7035.
- 82 Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, asap.
- 83 Gan, Z.; Roy, R. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 1155.
- 84 Fürstner, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3012.
- 85 Das, S. K.; Roy, R. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 4015.
- 86 Pour une bonne revision sur la synthèse des benzènes polysubstitués : Saito, S.; Yamamoto, Y. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2901.

CHAPITRE II

MANUSCRITS

2.1 Aryl *O*- and *S*-galactosides and lactosides as specific inhibitors of human galectins-1 and -3: role of electrostatic potential at O-3

Denis Giguère,^a Sachiko Sato,^b Christian St-Pierre,^b Suzanne Sirois,^a René Roy^{a,*}

^a*Departement of Chemistry, Université du Québec À Montréal, P.O. Box 8888, Succ. Centre-Ville Montreal, Que., Canada H3C 3P8*

^b*Research Centre for Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Université Laval 2705 boul. Laurier, RC-9700 Sainte-Foy Que., Canada G1V 4G2*

Publié pour le périodique *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. :

Giguère, D.; Sato, S.; St-Pierre, C.; Sirois, S.; Roy, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1668-1672.

2.1.1 Résumé

Les galectines possèdent un domaine de reconnaissance pour les résidus β -D-galactopyranosides où quatorze différents membres ont été identifiés chez les mammifères. Le rôle spécifique des galectines n'est pas très bien défini, mais tous les membres des galectines ont une très forte modulation de leurs expressions durant une étape de leur développement spécifique, sous différentes conditions pathologiques et physiologiques. Les galectines-1 et -3 semblent être impliquées dans le processus d'apoptose ainsi que dans le système immunitaire. De plus, la galectine-1 semble aussi être impliquée dans l'infection cellulaire par le VIH. Dans le but de créer des traitements potentiels anti-cancer, anti-inflammatoire ou même anti-VIH, des analogues du substrat naturel (LacNAc) ont été synthétisés dans le but d'augmenter l'affinité et la sélectivité pour les galectines-1 et -3. Nous avons fait la synthèse d'une petite librairie de *O*- et *S*-aryl thiogalactosides et lactosides pour vérifier l'effet d'un aglycone aromatique. La glycosidation catalysée par transfert de phase a permis d'obtenir rapidement le seul anomère désiré avec de bons rendements, dans un milieu aqueux légèrement basique. Certains thioglycosides ont été oxydés dans le but d'évaluer l'effet des sulfones anomériques correspondantes. Tous les composés synthétisés ont été évalués sur deux galectines (1 et 3) avec un essai d'inhibition d'hémagglutination. Les thiogalactosides semblent avoir une forte affinité pour la galectine-1, contrairement à la galectine-3 tandis que la sulfone anomérique ne permet pas d'obtenir une meilleure affinité pour les deux galectines. Parmi tous les dérivés lactosides synthétisés, le *p*-nitrophényl sulfone possède la meilleure affinité pour la galectine-1 (80 μ M). Il a été possible de déterminer une corrélation entre la propriété d'inhibition et le potentiel électronique de l'oxygène en position-3 de l'unité glucoside, des inhibiteurs évalués sur la galectine-1. L'oxygène en position-3 est responsable de tous les liens hydrogènes directs avec la lectine. En modifiant l'aglycone, le potentiel électronique change en position O3 et modifie par le fait même la propriété d'inhibition.

2.1.2 Manuscript

Phase transfer catalyzed (PTC) reaction was used for the high yielding synthesis of aryl 1-thio- β -D-galacto- and lacto-pyranosides carrying a panel of substituents on the phenyl groups. Best galectin-1 inhibitors were simple *p*-nitrophenyl thiogalactoside **5a** for the monosaccharide and *o*-nitrophenyl thiolactoside **6f** or naphthylsulfonyl lactoside **8c** both being 20 times better relative to natural ligands. Relative inhibitory properties as low as 2500 and 40 μ M were observed, respectively. The electronic effects of the lactoside aglycons directly influenced the electrostatic potential at *O*-3 which was associated with the inhibitory potencies against galectin-1.

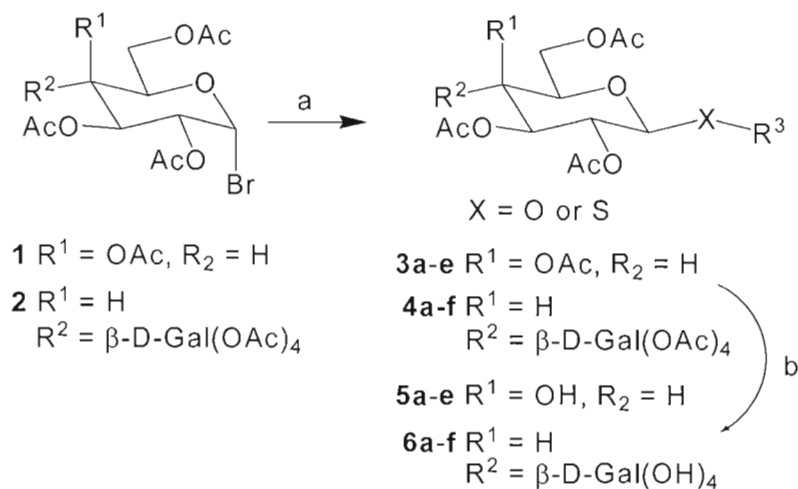
The galectins are a family of cytosolic β -D-galactoside binding proteins for which fourteen members have been identified in mammals.¹⁻⁴ Galectins-1 and -2 possess one carbohydrate recognition domain (CRD) per subunit and exist as dimers, in comparison to galectins-4, -8 and -9 which are connected to a short linker region. Galectin-3 (Gal-3) is unique and exists as chimera type composed of one CRD connected to non-CRD domain consisting of collagen-like repeats of a peptide sequence rich in proline and glycine, and is capable of self-association. The C-terminal CRD domain of Gal-3 is homologous to that of Gal-1.⁵ The role of the galectins is not yet clear, but a striking common feature of all galectin members is the strong modulation of their expression during development, differentiation stages, and under various physiological or pathological conditions.² Gal-3 possess diverse biological activities and is involved in colon cancer metastasis,⁶ brain tumor progression,⁷ inhibits metastasis-associated cancer cell adhesion,⁸ and may play a key role in innate immunity.^{9, 10} Recent reports suggest that Gal-3¹¹ and Gal-1¹²⁻¹⁴ can regulate cell apoptosis.¹⁵ Also, Gal-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells.¹⁶ Thus, selective

inhibition of galectins may lead to anti-cancer, anti-inflammatory, or even anti-HIV properties.^{2, 16-18}

Naturally occurring carbohydrate ligands for galectins have low affinities, are too polar to be used as drugs, and possess poor physiological stabilities due to their acid sensitive glycosidic bonds.¹⁹ For instance, galactose and lactose have inhibitory properties of 50 mM and 0.8 mM for both Gal-1 and Gal-3, respectively. Combining experimental informations from the binding data and high resolution X-Ray crystal structures of galectin-carbohydrate ligand complexes enables rational design approach for the development of new classes of glycomimetic inhibitors with high affinity, stability, and specificity.²⁰⁻²⁵ Nilsson *et al.* have explored the 3'-position of a panel of lactoside derivatives for the synthesis of high affinity inhibitors of Gal-3 using benzamido²⁰⁻²² or triazole²³ functionalities. We report herein the efficient synthesis of small libraries of aryl thiogalactosides and lactosides using phase transfer catalysis reaction (PTC) with the aim to further explore the effect of the aglycons on the relative affinity toward galectins.^{24,25} Encouraging inhibitory properties were obtained for inhibitors having anomeric sulfides that conferred better stability under physiological conditions. The attachment of aryl groups also increased the lipophilicities of the molecules, a desirable property for better cell permeabilities in *in vivo* assays. All the reactions were efficiently accomplished at room temperature under mildly basic conditions, proceeded with good to excellent yields, and were essentially completed within three hours under non-anhydrous conditions.²⁶ Exploration of anomeric sulfones from anomeric sulfide oxidation has also been accomplished.

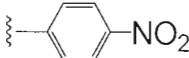
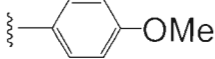
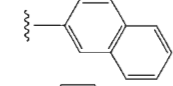
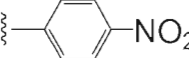
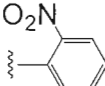
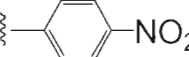
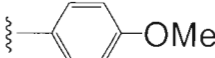
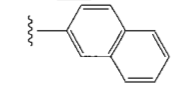
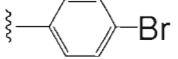
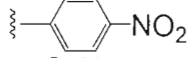
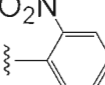
Reactions toward Gal-1 and -3 inhibitors started from commercially available acetobromogalactose **1** and peracetylated lactosyl bromide **2** which was obtained in quantitative yield by treatment of lactose peracetate with HBr in AcOH. As expected, the phase transfer catalyzed nucleophilic displacements of both glycosyl bromides by

the aryl alcohols or aryl thiols occurred with complete anomeric inversion to afford only the corresponding β -glycoside derivatives **3a-e** and **4a-f**, respectively (Scheme 1). After de-*O*-acetetylations with methanolic sodium methoxide, compounds **5a-e** and **6a-f** were obtained in good to excellent yields (Table 1) and were ready to be evaluated on the galectins using an inhibition of hemagglutination assay described below, with only two synthetic steps.



Scheme 1 Reagents and conditions: (a) HXR_3 ($\text{X} = \text{O}$ or S), TBAHS, 1M Na_2CO_3 , DCM; (b) NaOMe, MeOH.

Table 1 Synthesis of different *O*- and *S*-galacto- and lacto-pyranosides **5-6** using PTC reactions followed by treatment with methanolic sodium methoxide.

Comp.No.	R ¹	R ²	R ³	X	Yield (%)
5a	OH	H		S	92
5b	OH	H		S	86
5c	OH	H		S	78
5d	OH	H		O	^a
5e	OH	H		O	73
6a	H	β-D-Gal(OH) ₄		S	91
6b	H	β-D-Gal(OH) ₄		S	98
6c	H	β-D-Gal(OH) ₄		S	93
6d	H	β-D-Gal(OH) ₄		S	88
6e	H	β-D-Gal(OH) ₄		O	85
6f	H	β-D-Gal(OH) ₄		O	75

^a Commercially available.

With arylthio glycosides **3b**, **4c** and **4d** in hand, synthesis of anomeric sulfones by oxidation of the sulfide groups using *m*CPBA (2.1 equiv., CH₂Cl₂) afforded sulfones **7b**, **8c** and **8d**, respectively, after de-O-acetylation (Scheme 2) (Table 2).

Table 2 Synthesis of sulfones **7-8** using *m*CPBA as an oxidizing agent.

have beneficial effect (**7b**). Amongst all galactosyl derivatives tested, *p*-nitrothiophenyl galactoside **5a** demonstrated the best affinity (2500 μ M) with a relative inhibitory potency 20 times better than the control galactose **9**. Lactosides **6f** and **8c** were more specific toward Gal-1 than Gal-3.

Table 3 Inhibitory properties of inhibitors **5-10** against Gal-1 and -3.

Compd. No.	Inhibitory properties (mM)		Relative affinity ^{a,b}	
	Galectin-1	Galectin-3	Galectin-1	Galectin-3
5a	2.5	>5	20	>10
5b	>5	2.5	>10	20
5c	5	5	10	10
5d	10	10	5	5
5e	>5	>5	>10	>10
6a	0.313	0.313	2.6	2.6
6b	0.313	0.313	2.6	2.6
6c	0.313	0.313	2.6	2.6
6d	0.313	0.313	2.6	2.6
6e	0.313	0.625	2.6	1.3
6f	0.08	0.625	10	1.3
7b	>5	>5	>10	>10
8c	0.04	0.313	20	2.6
8d	0.313	0.313	2.6	2.6
9 (Gal)	50	50	1	1
10 (Lac)	0.8	0.8	1	1

^aCompounds **5** and **7** were compared to galactose **9**, compounds **6** and **8** were compared to lactose **10**. ^bLactose is ~50x better than Galactose.

Most *O*-aryl lactosides were estimated as being 3 times better than the natural analogue **10**, thus indicating a preference for aromatic aglycons.^{24, 25} *S*-Lactosides were less potent than *O*-lactosides for Gal-3 (**6a** compared to **6e**). For Gal-1 (**8c**,²⁹ 40 μ M), the presence of an anomeric sulfone provided a compound 20 times better than

lactose **10**. The position of the nitro group on the phenyl moiety seemed to play a key role for the specificity between Gal-1 and -3. There was no increase of inhibitory potency for Gal-3 when the nitro group was *para*- or *ortho*-substituted (**6e** and **6f**). Gal-1 was sensitive to this change and became 10 times more potent than the reference **10** when the nitro group was *ortho*-substituted (**6f**, 80 μ M).

The nitro group position might be important not only from a steric point of view but also from an electrostatic one. Figure 1 shows the *O*-linked *o*-nitrophenyl lactoside **6f** extending out of the CRD pocket, thus lacking direct interactions with the lectin itself.³⁰

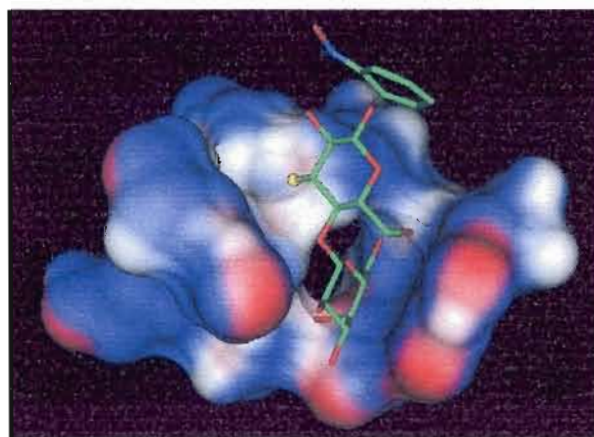


Figure 1 Connolly surface using a grid spacing of 0.75 colored by Active Lone Pair and docking of **6f** in Gal-1 showing the *o*-nitrophenyl aglycon pointing out of the CRD pocket and O-3 (yellow) into an H-bonding network. The blue regions are hydrophobic, the red are hydrophilic while the white indicate regions through which hydrogen bonds are likely to form.

This suggested that the inhibitory specificity was provided from indirect contributions. Hydrogen bondings between Gal-1 and natural lactose only occurred through its O-3 hydroxyl group (Figure 2) with two coming from ARG48, one from

GLU71, and one from the endocyclic oxygen of the galactoside moiety.³¹ These interactions create a network of three hydrogen bonds which are a common features in carbohydrate-lectin recognitions.³²⁻³⁴ Semi-empirical calculations correlated the chemical modifications done at the anomeric position with the effect on charge density at the O-3 oxygen of the glucoside residue of lactose.

The O-3 electron density calculations were made on all lactoside derivatives evaluated on Gal-1. Electron withdrawing aglycons decreased the O-3 electronic densities and favored better interactions with GLU71 which accounted for 50 % of the hydrogen bonding.

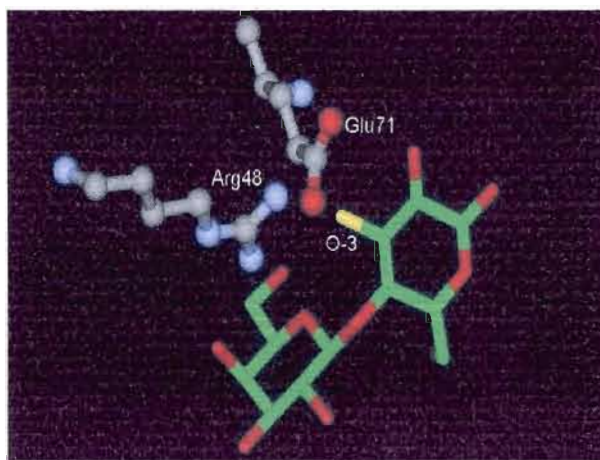


Figure 2 O-3 (yellow) Hydrogen bonding interactions from lactose **10** and Arg48 and Glu71 residues of Gal-1 based on X-ray crystal structure.³⁰

Hence, a direct correlation exists between the inhibitory potencies and the charge density at O-3 calculated on electrostatic potential. Figure 3 reveals the correlation between the inhibitory properties and the electron density of compounds **6e**, **6f**, **8c**, and reference **10** (**6a-d** not shown).³⁵ *O*-Lactoside **6e** (*p*-nitrophenyl) possesses a theoretical electron density of -0.346 compared to *o*-nitrophenyl **6f** of $-$

0.322. This difference of electron density could explain the relative inhibitory potency variation on Gal-1. Compound **8c** having the lowest O-3 electronegativity has also the lowest inhibitory potencies.

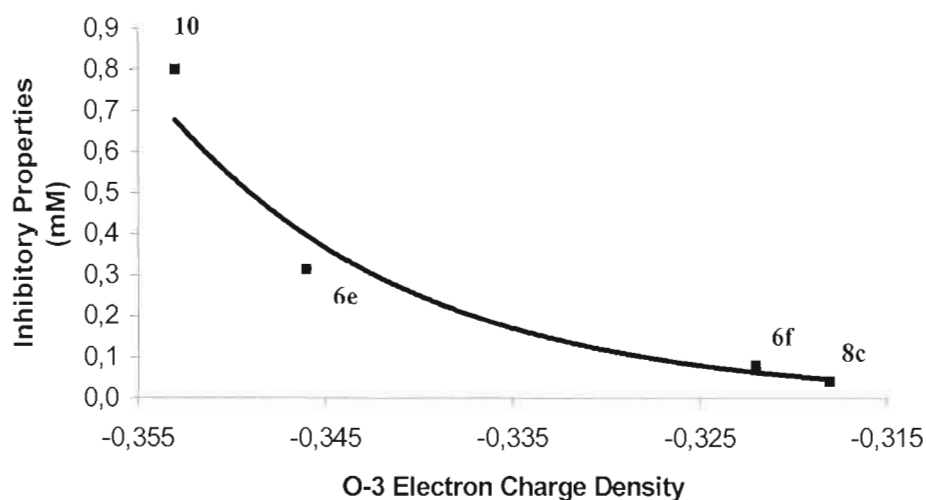


Figure 3 Correlation between O-3 electron charge density calculated on electrostatic potential of lactosides **6e**, **6f**, **8c** and reference **10** and the inhibitory properties (mM) of those compounds evaluated on Gal-1.

In conclusion, preliminary data showed a novel direction toward more specific Gal-1 and -3 inhibitors. Most compounds were made in high yields with only 2 or 3 synthetic steps from commercially available starting materials. The PTC reaction has proven its practicality for the synthesis of more stable and less polar inhibitors compared to natural ligands. The best inhibitors **5a** (2500 μM) and **8c** (40 μM) have shown 20 times better affinity toward Gal-1 as compared to galactose **9** and lactose **10**, respectively. The strategy used for the synthesis of inhibitors provides a large potential for further improvements by changing the nucleophiles in the PTC reaction. Additionally, the actual modifications, combined to those already published^{20-25, 36-38}

can lead to improved pharmacological properties. Finally, inhibitory data correlated with the electron density at the O-3 group of the glucose unit within the lactoside ligand that led to a greater inhibitory capacity for Gal-1. Current progresses are made by taking advantage of this effect and are guiding the design of more selective inhibitors against human galectins.³⁷ Although the above compounds are notably less efficient than those described by Nilsson *et al.*,²⁰⁻²³ we used inhibition of hemagglutination assays known to require higher concentration of ligand.

Acknowledgments

This work was supported from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and a Canadian Research Chair in Therapeutic Chemistry to RR and from Canadian Institutes for Health Research to SS.

2.1.3 References

- 1 Barondes, S. H.; Cooper, D. N. W.; Gitt, M. A.; Leffler, H. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 20807.
- 2 (a) Horrie, H. *Curr. Drug Targets.* **2005**, 6, 373; (b) Chiariotti, L.; Salvatore, P.; Frunzio, R.; Bruni, C. B. *Glycoconjugate J.* **2004**, 19, 441.
- 3 Cooper, D. N. W.; Barondes, S. H. *Glycobiology* **1999**, 9, 979.
- 4 Hirabayashi J.; Kasai K. *Glycobiology.* **1993**, 3, 297.
- 5 Elola, M. T.; Chiesa, M. E.; Alberti, A. F.; Mordoh, J.; Flink, N. E. *Biomed. Sci.* **2005**, 12, 13.
- 6 Bresalier, R. S.; Mazurek, N.; Stenberg, L. R.; Byrd, J. C.; Yunker, C. K.; Nangia-Makker, P.; Raz, A. *Gastroenterology* **1998**, 115, 287.
- 7 Yang, R.-Y.; Hsu, D. K.; Liu, F.-T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, 93, 6737.
- 8 Zou, J.; Glinsky, V. V.; Landon, L. A.; Matthews L.; Deutscher, S. L. *Carcinogenesis* **2005**, 26, 309.
- 9 (a) Sato, S.; Nieminem, J. *Glycoconjugate J.* **2004**, 19, 441; (b) Sato, S. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2002**, 14, 285.
- 10 Liu, F. T. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **2005**, 136, 385.
- 11 (a) Califice, S.; Castronovo, V.; Van Den Brule, F. *Int. J. Oncol.* **2004**, 25, 983; (b) Nakahara, S.; Oka, N.; Raz, A. *Apoptosis.* **2005**, 10, 267.
- 12 (a) Wiest, I.; Seliger, C.; Walzel, H.; Friese, K.; Jeschke, U. *Anticancer. Res.* **2005**, 25, 1575.
- 13 Szoke, T.; Kayser, K.; Baumhakel, J. D.; Trojan, I.; Furak, J.; Tiszlaviez, L.; Horvath, A.; Szluha, K.; Gabius, H.-J.; André S. *Oncology.* **2005**, 69, 167.
- 14 Battig, P.; Saudan, P.; Gunde, T.; Bachmann, M. F. *Mol. Immunol.* **2004**, 41, 9.
- 15 Hsu, D. K.; Liu, F. T. *Glycoconj. J.* **2004**, 19, 507; (b) Hermandes, J. D.;

- Baum, L. G. *Glycobiol.* **2002**, 12, 127R.
- 16 Ouellet, M.; Mercier, S.; Pelletier, I.; Bounou, S.; Roy, J.; Hirabayashi, J.; Sato, S.; Tremblay, M. J. *J. Immunol.* **2005**, 174, 4120.
 - 17 Rabinovich, G. A. *Br. J. Cancer.* **2005**, 92, 1188.
 - 18 Kato, T.; Ren, C. H.; Wada, M.; Kawanami, T. *Curr. Drug. Targets.* **2005**, 6, 407.
 - 19 Leffler, H.; Barondes, S. H. *J. Biol. Chem.* **1986**, 22, 10119.
 - 20 Sörme, P.; Qian, Y.; Nyholm, P.-G.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *ChemBioChem*, **2002**, 3, 183.
 - 21 Sörme, P.; Arnoux, P.; Kahl-Knutsson, B.; Leffler, H.; Rini, J. M.; Nilsson, U. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1747.
 - 22 Cumpstey, I.; Sundin, A.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5110.
 - 23 (a) Salameh, B. A.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 3344; (b) Cumpstey, I.; Carlsson, S.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1922; (c) Tejler, J.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2343.
 - 24 Roy, R.; Tropper, F. D.; Cao, S.; Kim, J. M. *Phase Transfert Catalyst Mechanisms and Syntheses*. ACS Symposium Series. **1997**, Chap. 13, 163pp.
 - 25 Carrière, D.; Meunier, S. J.; Tropper, F.D.; Cao, S.; Roy, R. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2000**, 154, 9.
 - 26 Cao S.; Meunier, S. J.; Andersson, F. O.; Letellier, M.; Roy, R. *Tetrahedron: Asymetry.* **1994**, 5, 2303.
 - 27 Butler, W.T. *J. Immunol.* **1963**, 90, 663.
 - 28 Concentration at 0.5 μ M for Gal-4. All compound were also tested on Gal-9 at 0.5 μ M except for **5c**, **6e** and **6f** for which no inhibition at 5 mM was observed.
 - 29 This compound was difficult to dissolve, 5% of DMSO was used at which hemagglutination by galectins were not affected.

- 30 Docking was made with the MOE program. The PDB entry for Gal-1 was 1GZW.
- 31 Lopez-Lucendo, M. F.; Solis, D.; André, S.; Hirabayashi, J.; Kasai, K.-i.; Kaltner, H.; Gabius, H.-J.; Romero, A. *J. Mol. Biol.* **2004**, 343, 957.
- 32 Manoj, N.; Srinivas, V. R.; Surolia, A.; Vijayan, M.; Suguna, K. *J. Mol. Biol.* **2000**, 302, 1129.
- 33 Imberty, A.; Gauthier, C.; Lescar, J.; Pérez, S.; Wynsi, L.; Loris, R. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 17541.
- 34 Ng, K. K.-S.; Weis, W. I. *Biochemistry.* **1997**, 36, 979.
- 35 All electrostatic potential calculations were made with the CaChe software.
- 36 Ahmad, N.; Gabius, H.-J.; André, S.; Kaltner, H.; Sabesan, S.; Roy, R.; Liu, B.; Macaluso, F.; Brewer, C. F. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 10841.
- 37 André, S.; Liu, B.; Gabius, H.-J.; Roy, R. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3909.
- 38 Compound **8c**: mp 181.5-182.5 °C; $[\alpha]_D^{25} +6.5$ (c = 1, DMSO); ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) : 8.51 (s, 1H, H_{AR}), 8.03-7.87 (m, 4H, H_{AR}), 7.66-7.58 (m, 2H, H_{AR}), 4.42 (d, $J = 9.34$ Hz, H-1), 4.21 (d, $J = 7.42$ Hz, 1H, H-1'), 3.65-3.26 (m, 12 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6a', H-6b'); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) : 135.2, 133.5, 132.8, 130.7, 130.6, 129.9, 129.04, 128.7, 128.7, 125.5 (7 C=O), 104.9 (C-1'), 92.9 (C-1), 81.1 (C-4), 78.9 (C-3), 77.4 (C-2), 77.1 (C-5), 74.8 (C-3'), 72.5 (C-5'), 71.3 (C-2'), 70.3 (C-4'), 62.5 (C-6), 61.5 (C-6').

2.1.4 Supporting Information

Materials and methods:

All reactions involving water-sensitive chemicals were carried out in flame-dried glassware with magnetic stirring under a nitrogen atmosphere. Anhydrous DCM was distilled from CaH_2 and anhydrous THF were distilled from Na/K prior to use. All non-aqueous reactions were carried out under anhydrous conditions within a nitrogen atmosphere in distilled solvents. All other solvents and reagents were used as received. TLC was performed on aluminium plates (silica gel 60 F₂₅₄) with detection by UV or by coloration with ammonium molybdate in acid solution. Column chromatography were performed on silica gel (230-400 mesh) with the indicated eluent. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 300 (75) MHz with a Variant apparatus. Chemical shifts (ppm) are reported relative to CHCl_3 (7.27) or D_2O or CD_3OD as internal standard. Optical rotations were measured on a Polarimeter JASCO P-1000, melting point on a Fisher-Johns Point Apparatus and ESI-MS analyses were carried out on a MICROMASS Quattro LC.

Typical procedure for PTC glycosylation:

General procedure for PTC glycosylation: To a solution of glycosyl halides (1 equiv.) and tetrabutyl ammonium hydrogen sulfate (TBAHS) (1 equiv.) in ethyl acetate (1.0mL/100 mg of sugar) were added the nucleophile (2-3 equiv.) and 1 M sodium carbonate (1.0 mL/100 mg of sugar). The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature until the starting material was completely consumed (1-3 h.) as judged by TLC monitoring using a mixture of ethyl acetate and hexane as eluent. The solution was then diluted with ethyl acetate and the organic phase was

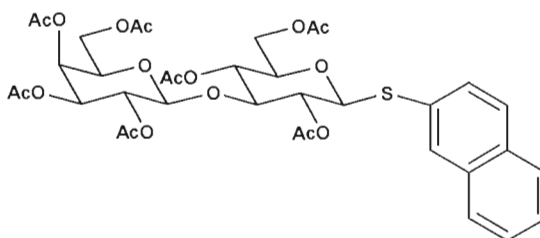
separated. The organic solution was washed with saturated sodium bicarbonate, water and brine, then dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residues were purified by silica gel column chromatography using a mixture of ethyl acetate and hexane as eluent. Pure glycosyl derivatives were obtained after silica gel column chromatography and usually recrystallised from ethanol.

Typical procedure for de-*O*-acetylation:

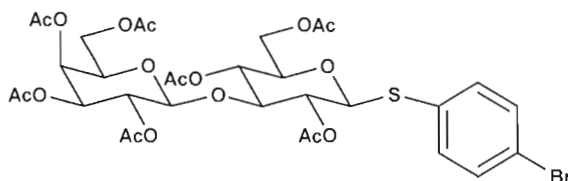
The acetyl protected glycoside (0.1 mmol) was dissolved into methanol (2 mL), to which was added a catalytic amount of sodium methoxide. The solution was stirred at room temperature until disappearance of the starting material (usually less than 3 hours). After neutralization of sodium methoxide with Amberlite IR-120 (H⁺) resin, the solution was filtered and removal of the methanol under reduced pressure afforded the fully deprotected glycoside.

Spectroscopic data:

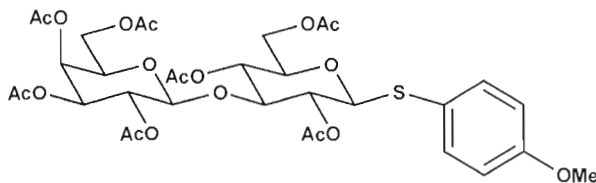
Spectroscopic data of compounds **5a**¹, **5b**², **5c**³, **5d**⁴, **5e**⁵, **6a**⁶, **6e**⁷ and **6f**⁸ are described in their appropriate reference.



β -Naphthyl 2,2',3,3'4',6,6'-hepta-*O*-acethyl-1-thio- β -D-lactoside **4c** was obtained as a white powder and had m. p. 126.3-127.0 °C; $[\alpha]_D - 17.2$ ($c = 1$, CHCl_3); IR 1771 cm^{-1} (s, $\text{O}-\text{C}=\text{O}$); ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 7.98 (1H, s, H_{AR}), 7.85-7.77 (3H, m, H_{AR}), 7.56-7.45 (3H, m, H_{AR}), 5.33 (1H, dd, $J = 3.8$ Hz, H-4'), 5.24 (1H, dd, $J = 8.7$ Hz, H-3), 5.09 (1H, dd, $J = 7.6$ Hz, H-2'), 4.96-4.906 (1H, m, H-3'), 4.94 (1H, dd, $J = 9.8$ Hz, H-2), 4.75 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-1), 4.55 (1H, dd, $J = 10.4$ Hz, H-6a), 4.46 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 4.14-4.03 (3H, m, H-6a', H-6b, H-6b'), 3.85 (1H, ddd, $J = 6.5$ Hz, H-5'), 3.77-3.66 (2H, m, H-4, H-5); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 170.3, 170.1, 170.0, 169.8, 169.0 (7 CH_3CO), 133.3, 132.9, 130.4, 128.5, 128.3, 127.7, 127.6, 126.7, 126.6 (10 C_{AR}), 101.0 (C-1'), 85.3 (C-1), 76.0 (C-4), 73.8 (C-3, C-5), 70.9 (C-3'), 70.6 (C-5'), 70.3 (C-2), 69.0 (C-2'), 66.5 (C-4'), 62.0 (C-6), 60.7 (C-6'), 20.7, 20.6, 20.4 (7 CH_3CO); ESI-MS calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{O}_{17}\text{S}_1 + (\text{Na}^+)$: 801.2; found: 801.3.

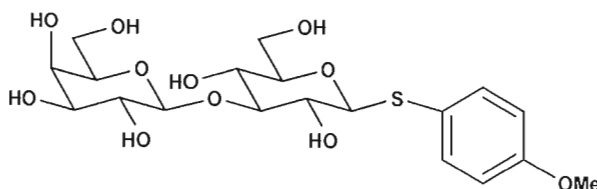


p-Bromophenyl 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-*O*-acetyl-1-thio-β-*D*-lactoside **4d** was obtained as a white powder and had m. p. 167.0-168.0 °C; $[\alpha]_D - 21.9$ ($c = 1$, CHCl_3); IR 1766 cm^{-1} (s, $\text{O}-\text{C}=\text{O}$); ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 7.43 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-*meta*), 7.35 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-*ortho*), 5.34 (1H, dd, $J = 2.7$ Hz, H-4'), 5.21 (1H, dd, $J = 9.0$ Hz, H-3), 5.10 (1H, dd, $J = 7.9, 10.4$ Hz, H-2'), 4.95 (1H, dd, $J = 3.5, 10.4$ Hz, H-3'), 4.85 (1H, dd, $J = 10.9$ Hz, H-2), 4.61 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-1), 4.54 (1H, dd, $J = 1.6, 11.8$ Hz, H-6a), 4.46 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 4.14-4.03 (3H, m, H-6a', H-6b, H-6b'), 3.86 (1H, ddd, $J = 6.3$ Hz, H-5'), 3.72 (1H, dd, $J = 9.8$ Hz, H-4), 3.69-3.63 (1H, m, H-5), 2.15, 2.11, 2.09, 2.05, 2.04, 2.03, 1.96 (7 CH_3CO); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 170.2, 170.1, 170.0, 169.6, 169.5, 168.9 (7 CH_3CO), 135.2 (C-*meta*), 131.9 (C-*ortho*), 130.1 (C-*ipso*), 123.0 (C-*para*), 101.0 (C-1'), 84.7 (C-1), 76.5 (C-4), 75.9 (C-3), 73.7 (C-5), 70.9 (C-3'), 70.6 (C-5'), 70.0 (C-2), 69.0 (C-2'), 66.5 (C-4'), 61.8 (C-6), 60.7 (C-6'), 20.8, 20.7, 20.5, 20.4 (7 CH_3CO); ESI-MS calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_{17}\text{Br}_1\text{S}_1 + (\text{NH}_4^+)$: 824.1; found: 824.2.

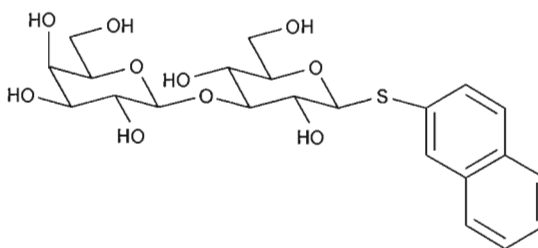


p-Methoxyphenyl 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-*O*-acetyl-1-thio-β-*D*-lactoside **6b-OAc** was obtained as a white powder and had m. p. 163.0-164.0 °C; $[\alpha]_D - 23.0$ ($c = 1$, CHCl_3); IR 1764 cm^{-1} (s, $\text{O}-\text{C}=\text{O}$), 1222 cm^{-1} (s, $\text{C}-\text{O}-\text{Me}$); ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 7.42 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-*ortho*), 6.83 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-*meta*), 5.33 (1H, dd, $J = 3.2$

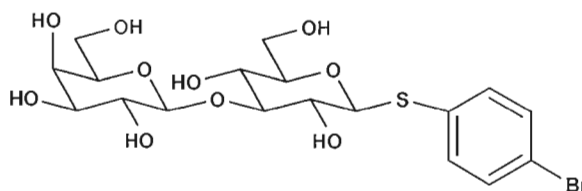
Hz, H-4'), 5.18 (1H, dd, $J = 9.0$ Hz, H-3), 5.09 (1H, dd, $J = 7.9, 10.4$ Hz, H-2'), 4.93 (1H, dd, $J = 3.2, 10.4$, H -3), 4.81 (1H, dd, $J = 9.8$ Hz, H-2), 4.52 (1H, dd, $J = 10.4$ Hz, H-6a), 4.45 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 4.50 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-1), 4.12-4.02 (3H, m, H-6a', H-6b, H-6b'), 3.85 (1H, ddd, $J = 6.5$ Hz, H-5'), 3.80 (3H, s, OMe), 3.69 (1H, dd, $J = 9.6$ Hz, H-4), 3.60 (1H, m, H-5), 2.14, 2.10, 2.03, 2.02, 1.96 (7 CH_3CO); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) : 170.2, 170.0, 169.6, 169.5, 168.9 (7 CH_3CO), 136.5 (C-*ortho*), 120.9 (C-*para*), 118.4 (C-*ipso*), 114.2 (C-*meta*), 100.9 (C-1'), 85.4 (C-1), 76.5 (C-4), 75.9 (C-3), 73.8 (C-5), 70.9 (C-3'), 70.6 (C-5'), 70.1 (C-2), 69.0 (C-2'), 66.5 (C-4'), 61.8 (C-6), 60.7 (C-6'), 55.2 (OMe), 20.8, 20.7, 20.5, 20.4 (7 CH_3CO); ESI-MS calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{O}_{18}\text{S}_1 + (\text{Na}^+)$: 781.2; found: 781.2.



p-Methoxyphenyl 1-thio- β -D-lactoside **6b** was obtained as a white crystal and had m. p. 167.5-169.5 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}} - 24.3$ ($c = 1$, MeOH); IR 3373 cm^{-1} (s, O-H) 1246 cm^{-1} (s, C-O-Me); ^1H NMR (CD_3OD) δ (ppm) : 7.42 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-*ortho*), 6.75 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-*meta*), 4.30 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-1'), 4.22 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1), 3.79-3.50 (6H, m, H-2, H-2', H-3, H-3', H-4', H-6a), 3.67 (3H, s, OMe), 3.46-3.04 (6H, m, H-4, H-5, H-5', H-6a', H-6b, H-6b'); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ (ppm) : 161.4 (C-*para*), 136.7 (C-*ortho*), 124.0 (C-*ipso*), 115.3 (C-*meta*), 104.9 (C-1'), 89.6 (C-1), 80.5 (C-4), 80.1 (C-3), 77.9 (C-5), 77.0 (C-2), 74.7 (C-3'), 73.1 (C-5'), 72.5 (C-2'), 70.3 (C-4'), 62.5 (C-6'), 62.0 (C-6), 55.7 (OMe); ESI-MS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_{11}\text{S}_1 + (\text{Na}^+)$: 487.1; found: 487.3.

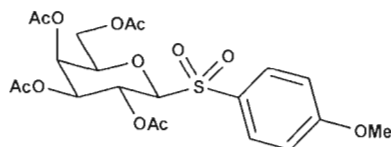


β -Naphthyl 1-thio- β -D-lactoside **6c** was obtained as a white powder and had m. p. 217.5-218.2 °C; $[\alpha]_D - 26.9$ ($c = 1$, DMSO); IR 3363 cm^{-1} (s, O-H); ^1H NMR (CD_3OD) δ (ppm) : 8.08 (1H, s, H_{AR}), 7.80 (3H, m, H_{AR}), 7.64 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H_{AR}), 7.47 (2H, t, $J = 3.8$ Hz, H_{AR}), 4.73 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-1'), 4.35 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1), 3.96-3.79 (2H, m, H-3, H-4'), 3.77-3.65 (4H, m, H-2', H-2, H-3', H-6a), 3.58-3.46 (6H, m, H-4, H-5, H-5', H-6a', H-6b, H-6b'); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ (ppm) : 131.7, 127.7, 130.4, 128.6, 128.5, 127.5, 127.2 (10 C_{AR}), 104.9 (C-1'), 89.0 (C-1), 80.6 (C-4), 80.1 (C-3), 78.0 (C-5), 77.1 (C-2), 74.8 (C-3'), 73.4 (C-5'), 72.5 (C-2'), 70.3 (C-4'), 62.5 (C-6'), 62.0 (C-6); ESI-MS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_{10}\text{S}_1 + (\text{Na}^+)$: 507.1; found: 507.3.

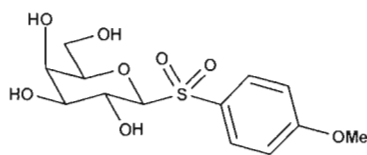


p-Bromophenyl 1-thio- β -D-lactoside **6d** was obtained as a white powder and had m. p. 207.0-208.0 °C; $[\alpha]_D - 38.1$ ($c = 1$, MeOH); IR 3337 cm^{-1} (s, O-H); ^1H NMR (CD_3OD) δ (ppm) : 7.36 (4H, m, H_{AR}), 4.49 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-1'), 4.25 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1), 3.78-3.59 (6H, m, H-2, H-2', H-3, H-3', H-4', H-6a), 3.51-3.21 (6H, m, H-4, H-5, H-5', H-6a', H-6b, H-6b'); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ (ppm) : 134.8 (C-*meta*), 134.2 (C-*ipso*), 132.9 (C-*ortho*), 122.4 (C-*para*), 104.9 (C-1'), 88.7 (C-1), 80.5 (C-4), 80.0 (C-3), 77.95 (C-5), 77.1 (C-2), 74.8 (C-3'), 73.3 (C-5'), 72.5 (C-2'), 70.3

(C-4'), 62.5 (C-6), 61.9 (C-6'); ESI-MS calcd for $C_{18}H_{25}O_{10}Br_1S_1 + (Na^+)$: 535.0; found: 535.2.

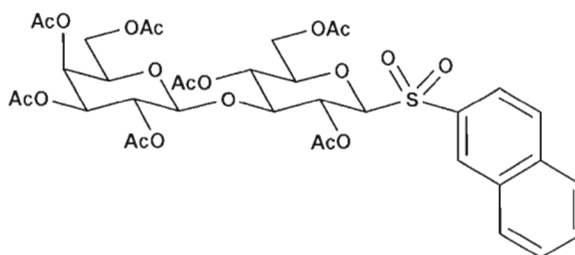


4-Methoxyphenyl sulphone 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-galactopyranoside **7b-OAc** was obtained as a white powder and had m.p. 115-116 °C; $[\alpha]_D -58.2$ ($c = 1$, $CHCl_3$); IR 1750 cm^{-1} (s, C=O), 1273 cm^{-1} (s, O=S=O); 1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) : 7.88 (2H, d, $J = 8.5\text{ Hz}$, H-*ortho*), 7.05 (2H, d, $J = 8.7\text{ Hz}$, H-*meta*), 5.42 (1H, dd, $J = 9.8\text{ Hz}$, H-2), 5.32 (1H, dd, $J = 3.29\text{ Hz}$, H-4), 5.04 (1H, dd, $J = 3.0, 9.8\text{ Hz}$, H-3), 4.47 (1H, d, $J = 9.6\text{ Hz}$, H-1), 4.11 (1H, dd, $J = 9.0, 13.1\text{ Hz}$, H-6a), 3.97-3.91 (2H, m, H-5, H-6b), 3.90 (3H, s, OMe), 2.15, 2.01, 1.98, 1.92 (12H, 4s, $\underline{CH_3CO}$); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) : 170.2, 169.9, 169.7, 169.5 (4 $\underline{CH_3CO}$), 164.5 (C-*para*), 132.9 (C-*ortho*), 125.9 (C-*ipso*), 113.9 (C-*meta*), 89.1 (C-1), 74.6 (C-5), 71.5 (C-3), 66.5 (C-4), 64.0 (C-2), 60.9 (C-6), 55.7 (OMe), 20.8, 20.6, 20.5, 20.3 (4 $\underline{CH_3CO}$); ESI-MS calcd for $C_{21}H_{26}O_{12}S_1 + (Na^+)$: 525.1; found: 525.3.

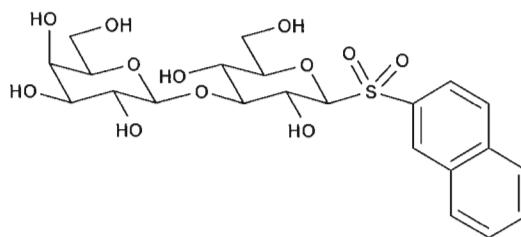


4-Methoxyphenyl sulphone 1-thio-β-D-galactopyranoside **7b** was obtained as a white powder and had m.p. 161-163 °C; $[\alpha]_D +1.0$ ($c = 1$, MeOH); IR 3377 cm^{-1} (s, O-H), 1268 cm^{-1} (s, O=S=O); 1H NMR (CD_3OD) δ (ppm) : 7.83 (2H, d, $J = 8.7\text{ Hz}$, H-*ortho*), 7.05 (2H, d, $J = 8.7\text{ Hz}$, H-*meta*), 4.25 (1H, d, $J = 9.6\text{ Hz}$, H-1), 3.85 (3H, s,

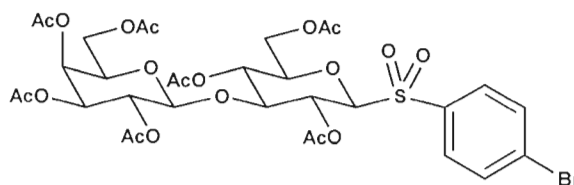
OMe), 3.81-3.78 (2H, m, H-2, H-4), 3.60-3.58 (2H, m, H-3, H-6a), 3.52-3.45 (2H, m, H-5, H-6b). ^{13}C NMR (CD_3OD) δ (ppm) : 165.8 (C-*para*), 133.1 (C-*ortho*), 129.3 (C-*ipso*), 115.2 (C-*meta*), 93.8 (C-1), 81.3 (C-5), 75.7 (C-3), 69.8 (C-4), 68.3 (C-6), 62.3 (C-2), 56.3 (OMe); ESI-MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{S}_1 + (\text{Na}^+)$: 357.1; found: 357.3.



β -Naphthyl sulphone 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-*O*-acetyl-1-thio- β -D-lactoside **8c-OAc** was obtained as a white powder and had m. p. 193-194 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}} -26.6$ ($c = 1$, CHCl_3); IR 1744 cm^{-1} (s, OAc), 1373 cm^{-1} (s, $\text{O}=\text{S}=\text{O}$); ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) : 8.48 (1H, s, H_{AR}), 8.07 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H_{AR}), 8.00-7.93 (2H, m, H_{AR}), 7.87-7.84 (1H, m, H_{AR}), 7.73-7.26 (2H, m, H_{AR}), 5.13-5.22 (3H, m, H-2', H-3, H-4'), 5.05 (1H, dd, $J = 7.6, 10.16$ Hz, H-2), 4.90 (1H, dd, $J = 3.2, 10.4$ Hz, H-3'), 4.52 (1H, d, $J = 9.0$, H-1), 4.49 (1H, dd, $J = 11.5$ Hz, H-6a), 4.11-3.97 (3H, m, H-6a', H-6b, H-6b'), 3.81 (1H, ddd, $J = 6.5$ Hz, H-5'), 3.66-3.61 (2H, m, H-4, H-5), 2.15, 2.13, 2.03, 2.00, 1.98, 1.94, 1.75 (21H, 7s, 7 CH_3CO); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) : 170.3, 170.1, 170.0, 169.8, 169.6, 169.5, 168.9 (7 CH_3CO), 135.7, 132.9, 131.9, 129.8, 129.7, 128.7, 127.8, 127.6, 124.6 (9 C_{AR}), 100.9 (C-1'), 88.7 (C-1), 75.1 (C-3, C-4), 73.1 (C-5), 70.8 (C-3'), 70.7 (C-5'), 68.9 (C-2'), 67.1 (C-2'), 66.5 (C-4'), 60.8 (C-6), 60.6 (C-6'), 20.7, 20.6, 20.5, 20.4 (7 CH_3CO); ESI-MS calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{O}_{19}\text{S}_1 + (\text{NH}_4^+)$: 828.2; found: 828.3.

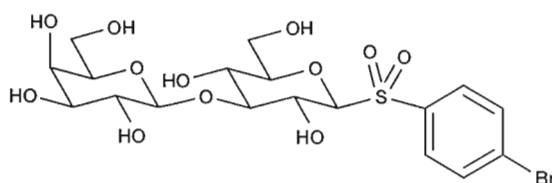


β -Naphthyl sulphone-1-thio- β -D-lactoside **8c** was obtained as a white powder and had m. p. 181.5-182.5 °C; $[\alpha]_D +6.5$ ($c = 1$, DMSO); IR 1310 cm^{-1} (s, O=S=O); ^1H NMR (CD_3OD) δ (ppm): 8.51 (1H, s, H_{AR}), 8.03-7.87 (4H, m, H_{AR}), 7.66-7.58 (2H, m, H_{AR}), 4.42 (1H, d, $J = 9.3\text{ Hz}$, H-1), 4.21 (1H, d, $J = 7.4\text{ Hz}$, H-1'), 3.65-3.26 (12H, m, H-2, H-2', H-3, H-3', H-4, H-4', H-5, H-5', H-6a, H-6a', H-6b, H-6b'); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ (ppm): 135.2, 133.5, 132.8, 130.7, 130.6, 129.9, 129.04, 128.7, 128.7, 125.5 (10 C_{AR}), 104.9 (C-1'), 92.9 (C-1), 81.1 (C-4), 78.9 (C-3), 77.4 (C-2), 77.1 (C-5), 74.8 (C-3'), 72.5 (C-5'), 71.3 (C-2'), 70.3 (C-4'), 62.5 (C-6), 61.5 (C-6'); ESI-MS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_{12}\text{S}_1 + (\text{Na}^+)$: 539.1; found: 539.3.



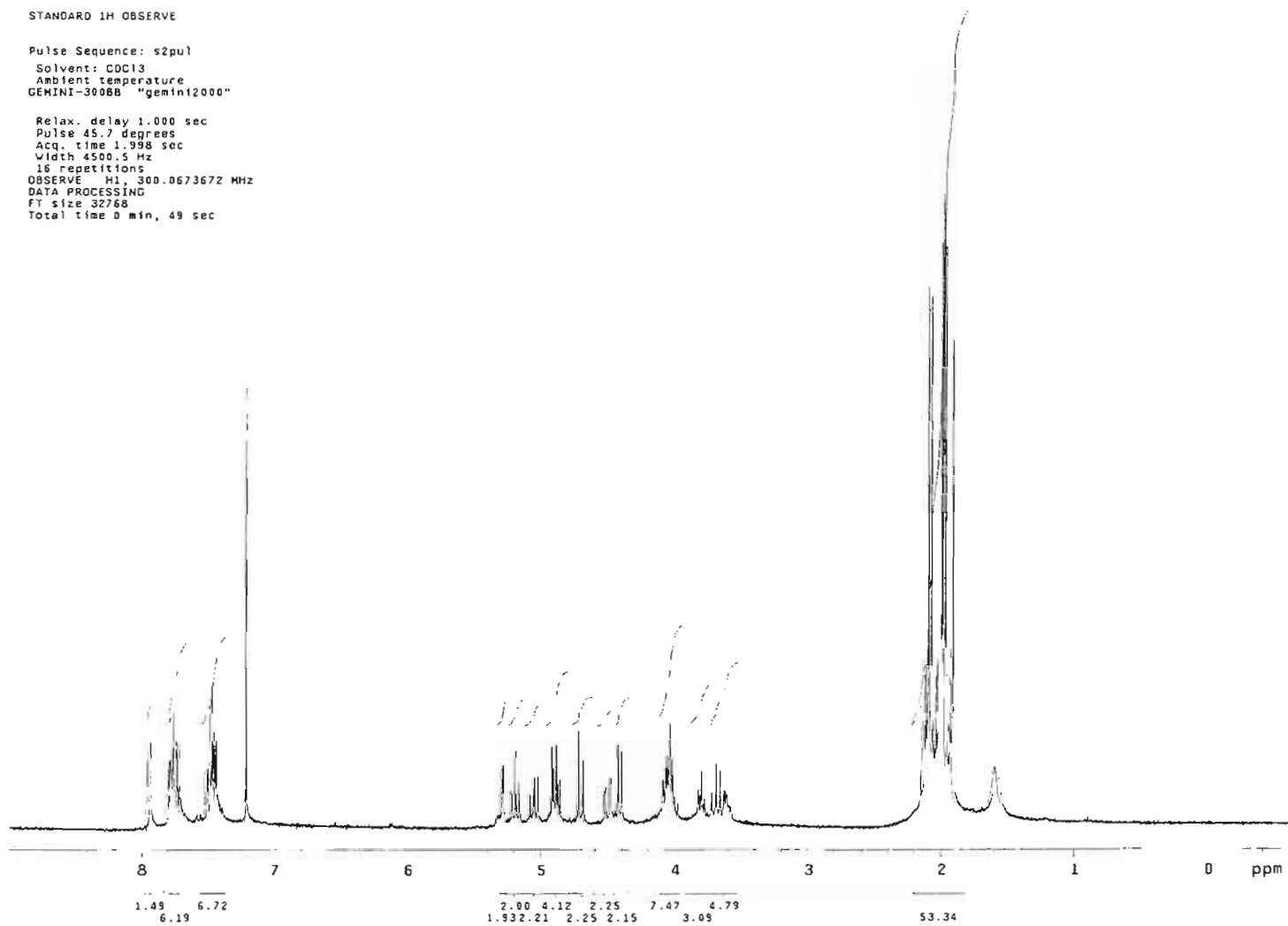
p-Bromophenyl sulphone 2,2',3,3'4',6,6'-hepta-*O*-acetyl-1-thio- β -D-lactoside **8d-OAc** was obtained as a white powder and had m. p. 215.5-216.5 °C; $[\alpha]_D - 28.8$ ($c = 1$, CHCl_3); IR 1749 cm^{-1} (s, O-C=O); ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 7.76-7.69 (4H, m, H_{AR}), 5.32 (1H, dd, $J = 2.4\text{ Hz}$, H-4'), 5.23 (1H, dd, $J = 8.7\text{ Hz}$, H-3), 5.18 (1H, dd, $J = 8.2\text{ Hz}$, H-2), 5.07 (1H, dd, $J = 7.6, 10.44\text{ Hz}$, H-2'), 4.93 (1H, dd, $J = 3.2, 10.44\text{ Hz}$, H-3'), 4.52 (1H, dd, $J = 12.0\text{ Hz}$, H-6a), 4.43 (1H, d, $J = 9.6\text{ Hz}$, H-1), 4.42 (1H, d, $J = 7.4\text{ Hz}$, H-1'), 4.14-3.98 (3H, m, H-6a', H-6b, H-6b'), 3.84 (1H, ddd, $J = 6.8$

Hz, H-5'), 3.68-3.61 (2H, m, H-4, H-5), 2.13, 2.11, 2.04, 2.03, 2.01, 2.00, 1.95 (7 CH_3CO); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 170.2, 170.0, 169.8, 169.5, 169.4, 168.8 (7 CH_3CO), 133.7 (C-*ipso*), 132.1 (C-*ortho*), 131.9 (C-*meta*), 130.1 (C-*para*), 100.9 (C-1'), 88.6 (C-1), 77.4 (C-4), 74.9 (C-3), 73.0 (C-5), 70.7 (C-3'), 70.7 (C-5'), 68.9 (C-2), 66.9 (C-2'), 66.4 (C-4'), 60.7 (C-6), 60.6 (C-6'), 20.6, 20.5, 20.4 (7 CH_3CO); ESI-MS calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_{19}\text{S}_1\text{Br}_1 + (\text{NH}_4^+)$: 856.1; found: 856.2.



p-Bromophenyl sulphone-1-thio- β -D-lactoside **8d** was obtained as a white powder and had m. p. 174.5-175.5 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}} - 9.5$ ($c = 1$, MeOH); IR 3305 cm^{-1} (s, O-H); ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 7.76 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-*ortho*), 7.68 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-*meta*), 4.32 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-1), 4.20 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1'), 3.67-3.31 (12H, m, H-2, H-2', H-3, H-3', H-4', H-4', H-5, H-5', H-6a, H-6a', H-6b, H-6b'); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ (ppm): 137.3 (C-*ipso*), 133.3 (C-*meta*), 132.6 (C-*ortho*), 130.4 (C-*para*), 104.8 (C-1'), 92.7 (C-1), 81.1 (C-4), 78.9 (C-3), 77.3 (C-5), 77.1 (C-2), 74.7 (C-3'), 72.4 (C-5'), 71.1 (C-2'), 70.3 (C-4'), 62.5 (C-6), 61.3 (C-6'); ESI-MS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{O}_{12}\text{S}_1\text{Br}_1 + (\text{NH}_4^+)$: 562.0; found: 562.2.

¹H NMR spectrum (300 MHz, CDCl₃) of compound 4c.

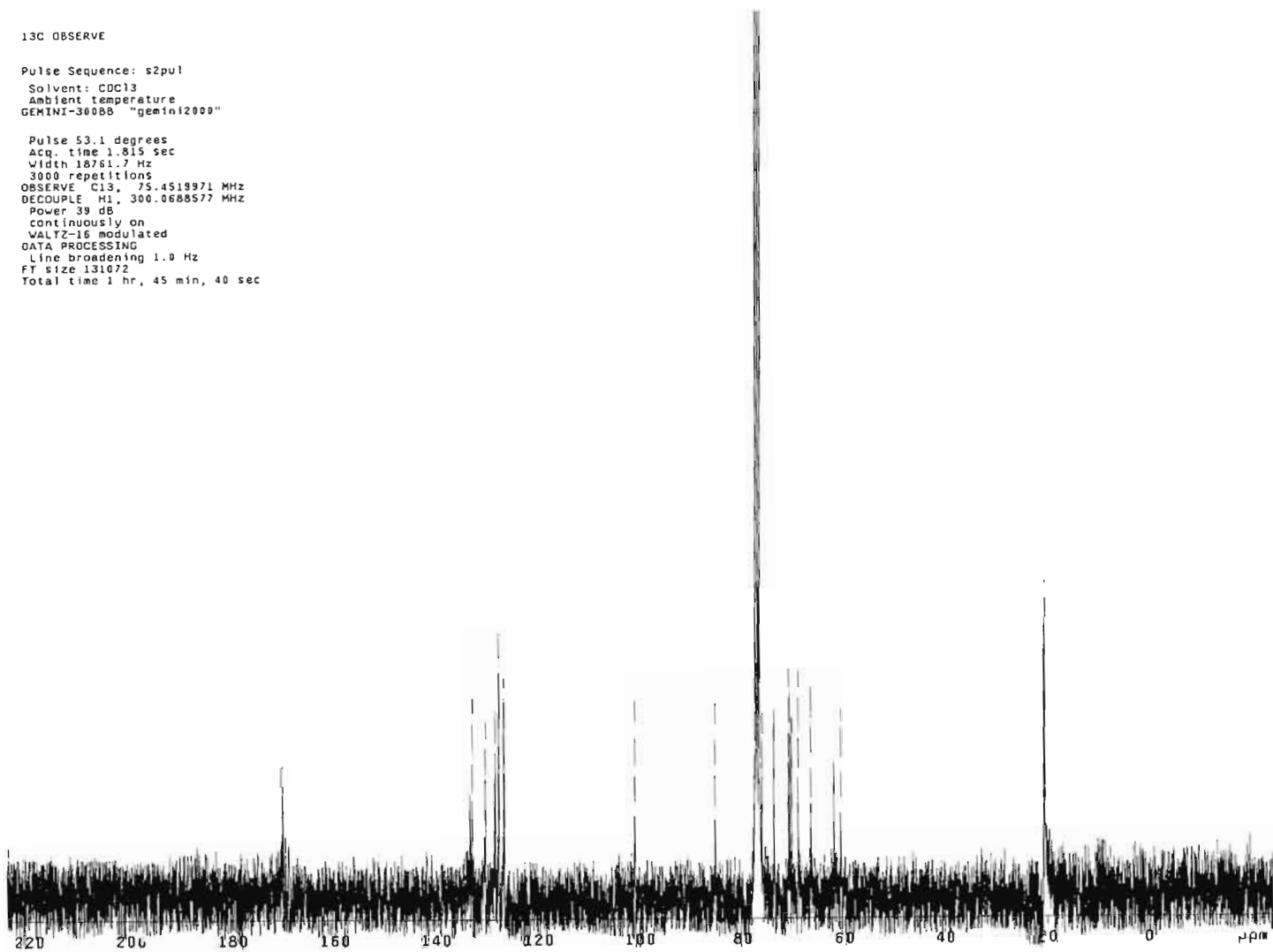


^{13}C NMR spectrum (75 MHz, CDCl_3) of compound 4c.

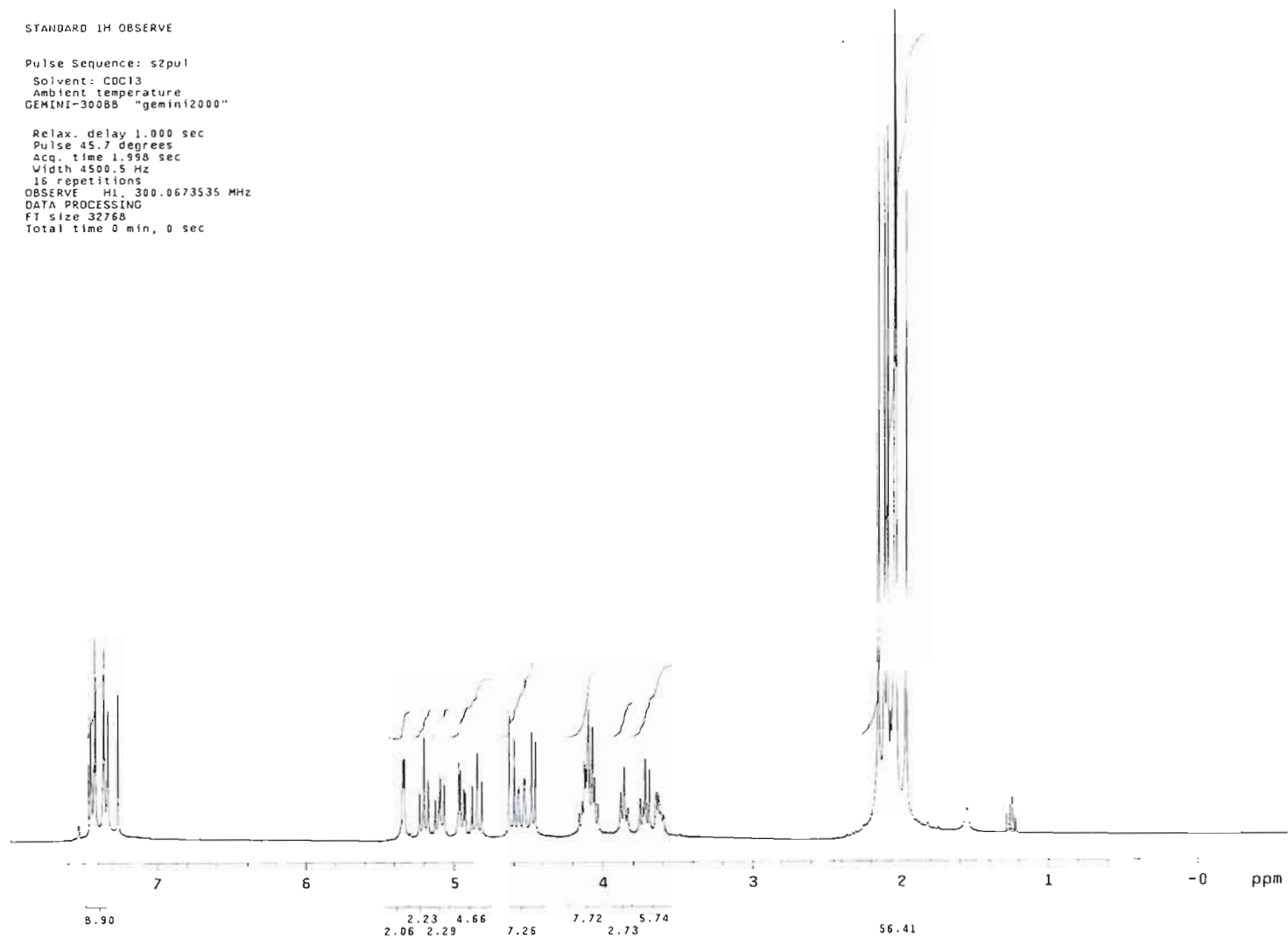
^{13}C OBSERVE

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl_3
Ambient temperature
GEMINI-3000B "geminiz000"

Pulse 53.1 degrees
Acq. time 1.815 sec
Width 18761.7 Hz
3000 repetitions
OBSERVE $\text{C}13$, 75.4519971 MHz
DECOUPLE $\text{H}1$, 300.0688577 MHz
Power 39 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131672
Total time 1 hr, 45 min, 40 sec



¹H NMR spectrum (300 MHz, CDCl₃) of compound **4d**.



^{13}C NMR spectrum (75 MHz, CDCl_3) of compound **4d**.

^{13}C OBSERVE

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl_3

Ambient temperature

GEMINI-30088 "gemin12000"

Pulse 53.1 degrees

Acq. time 1.815 sec

Width 18761.7 Hz

1024 repetitions

OBSERVE C13 , 75.4519977 MHz

DECOUPLE H1 , 300.0688577 MHz

Power 39 dB

Continuously on

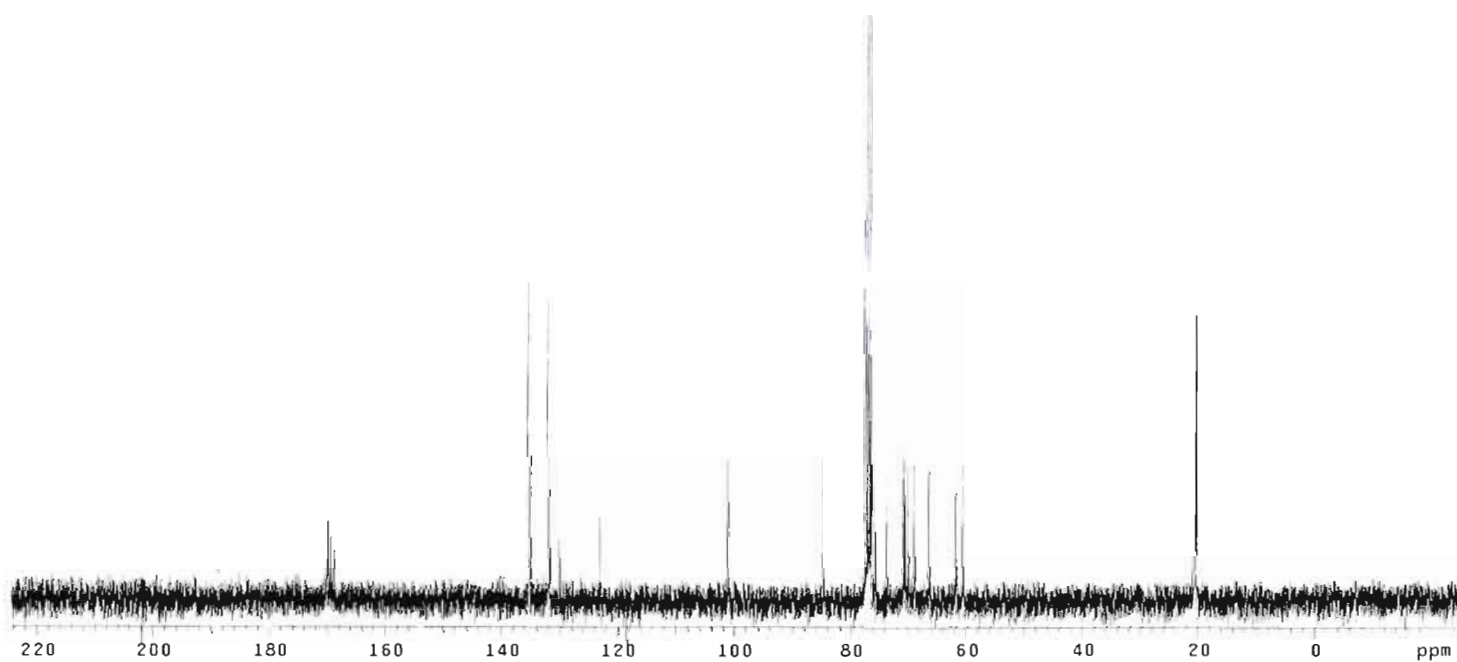
VALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 131072

Total time 36 min, 3 sec



¹H NMR spectrum (300 MHz, CDCl₃) of compound 6b-OAc.

STANDARD 1H OBSERVE

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: CDCl₃

Ambient temperature

GEMINI-300BB "gemini2000"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.7 degrees

Acq. time 1.998 sec

Width 4500.5 Hz

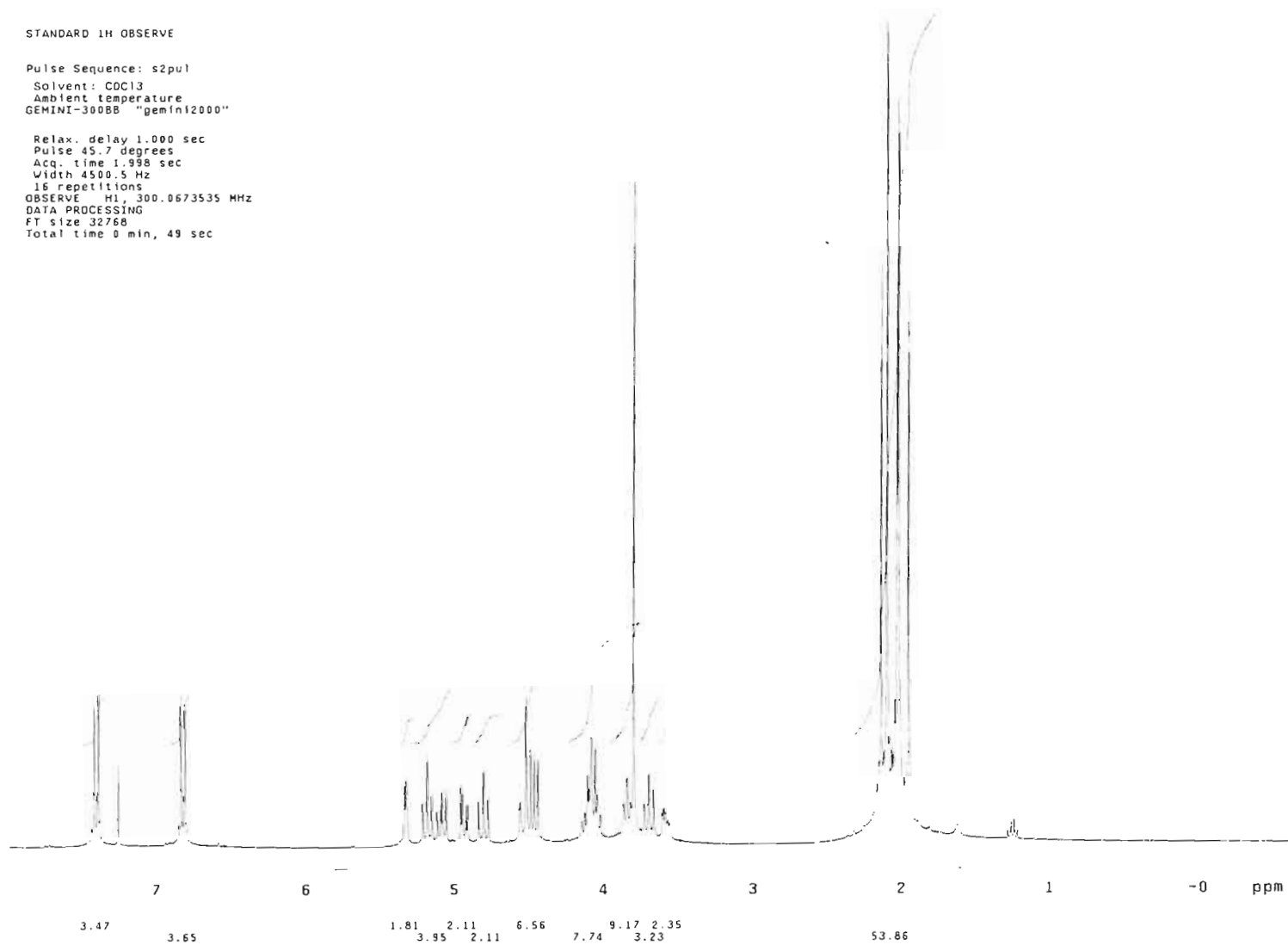
16 repetitions

OBSERVE H1, 300.0673535 MHz

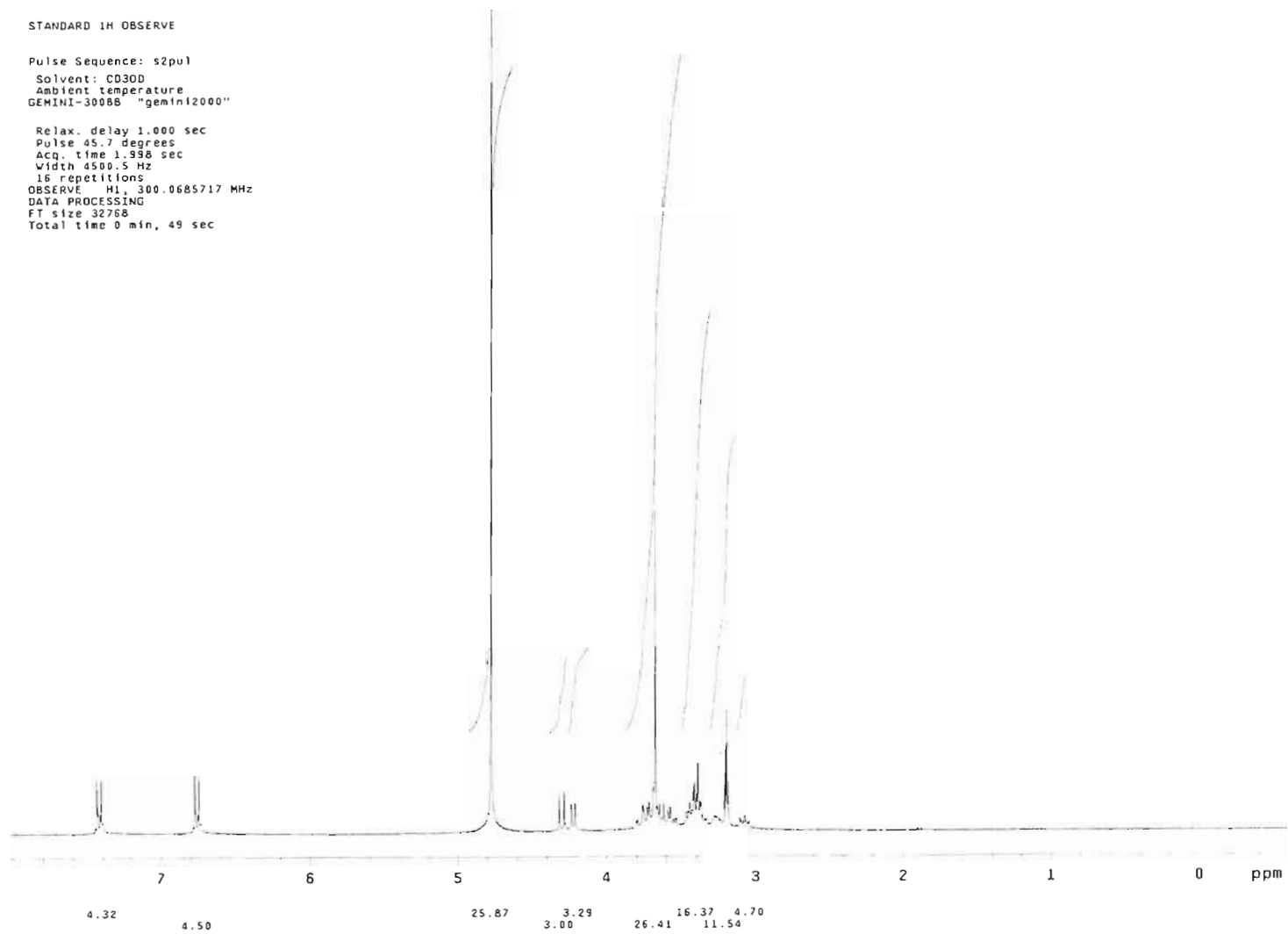
DATA PROCESSING

FT size 32768

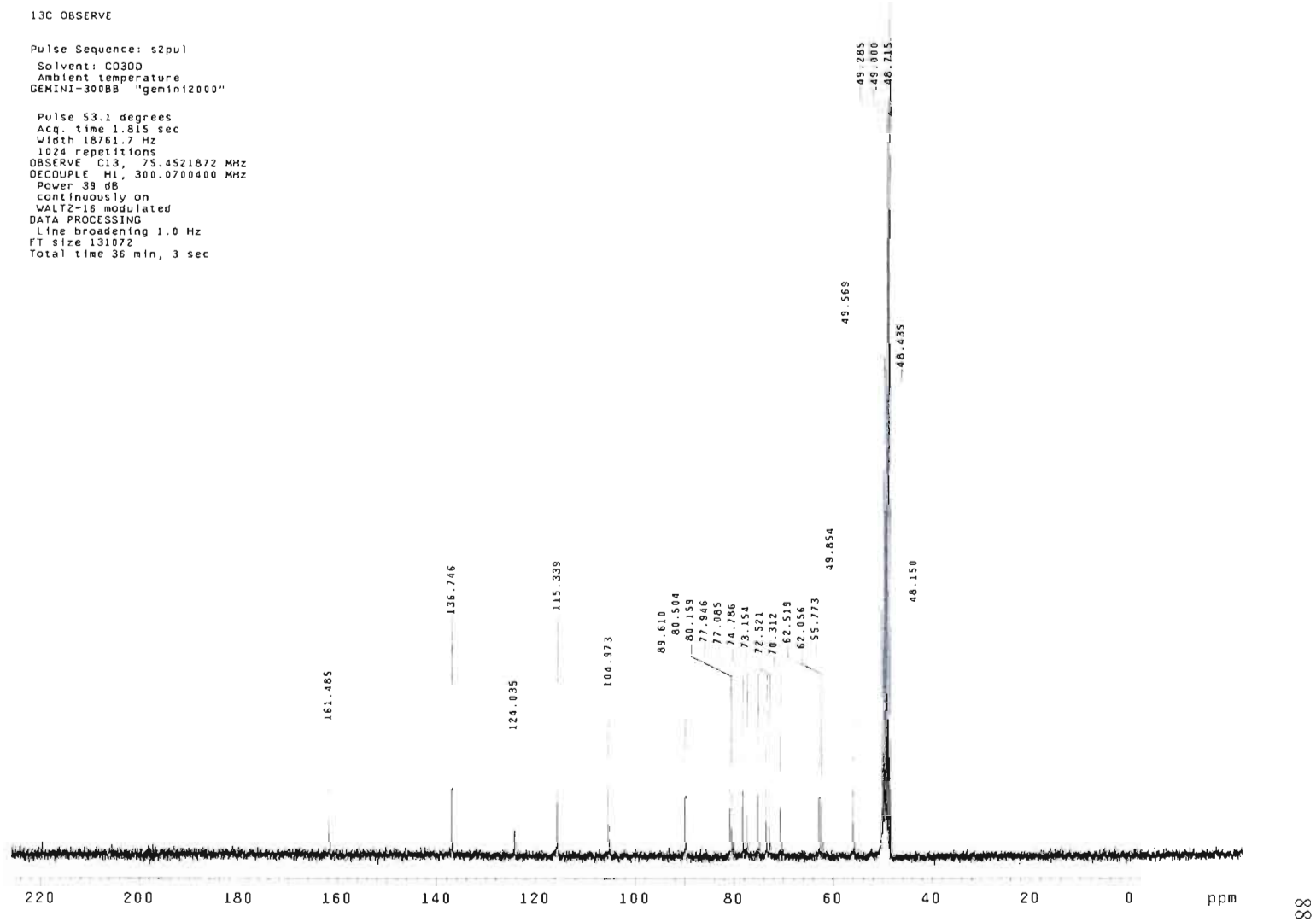
Total time 0 min, 49 sec



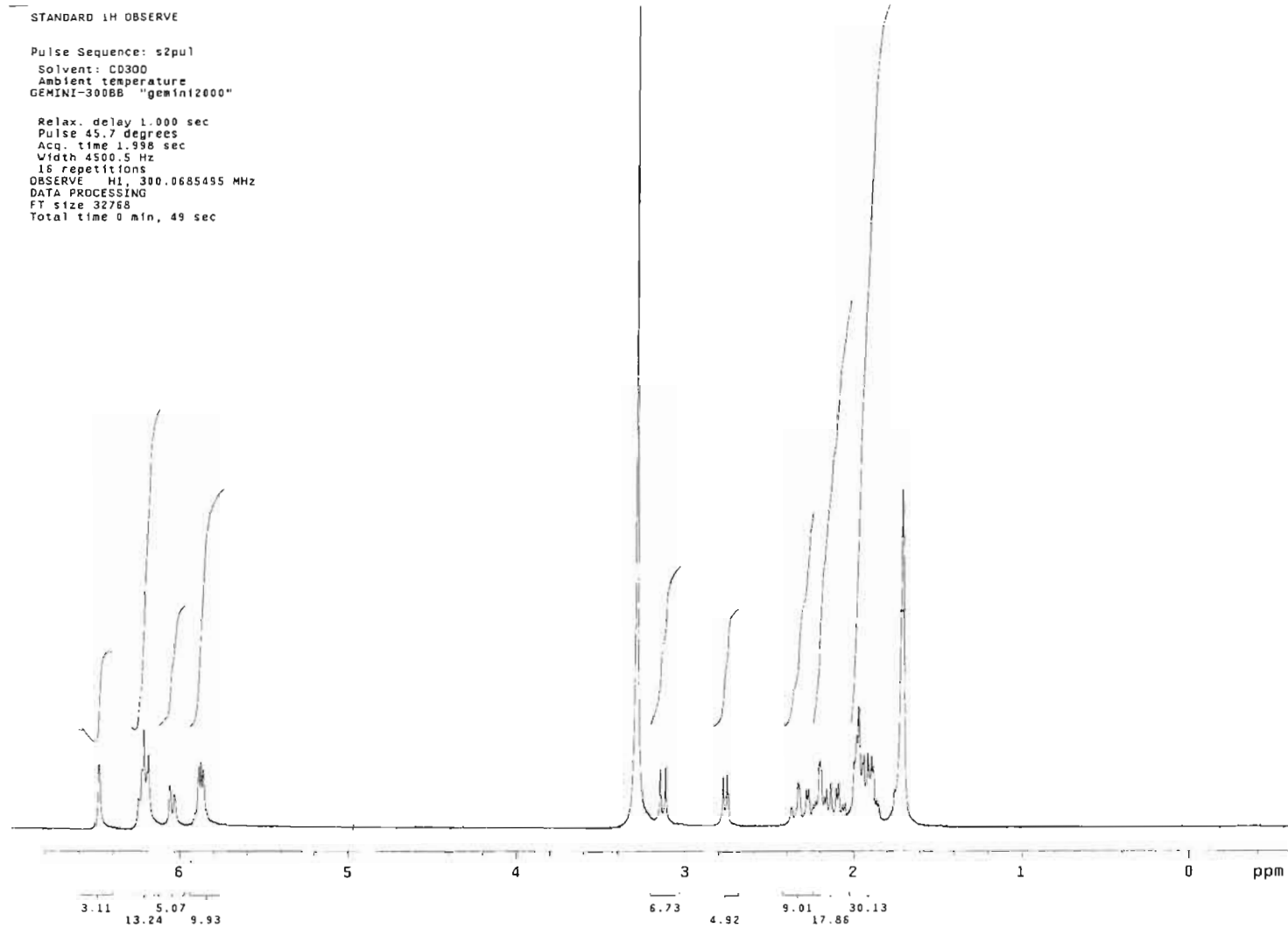
¹H NMR spectrum (300 MHz, CD₃OD) of compound 6b.



¹³C NMR spectrum (75 MHz, CD₃OD) of compound 6b.



¹H NMR spectrum (300 MHz, CD₃OD) of compound **6c**.

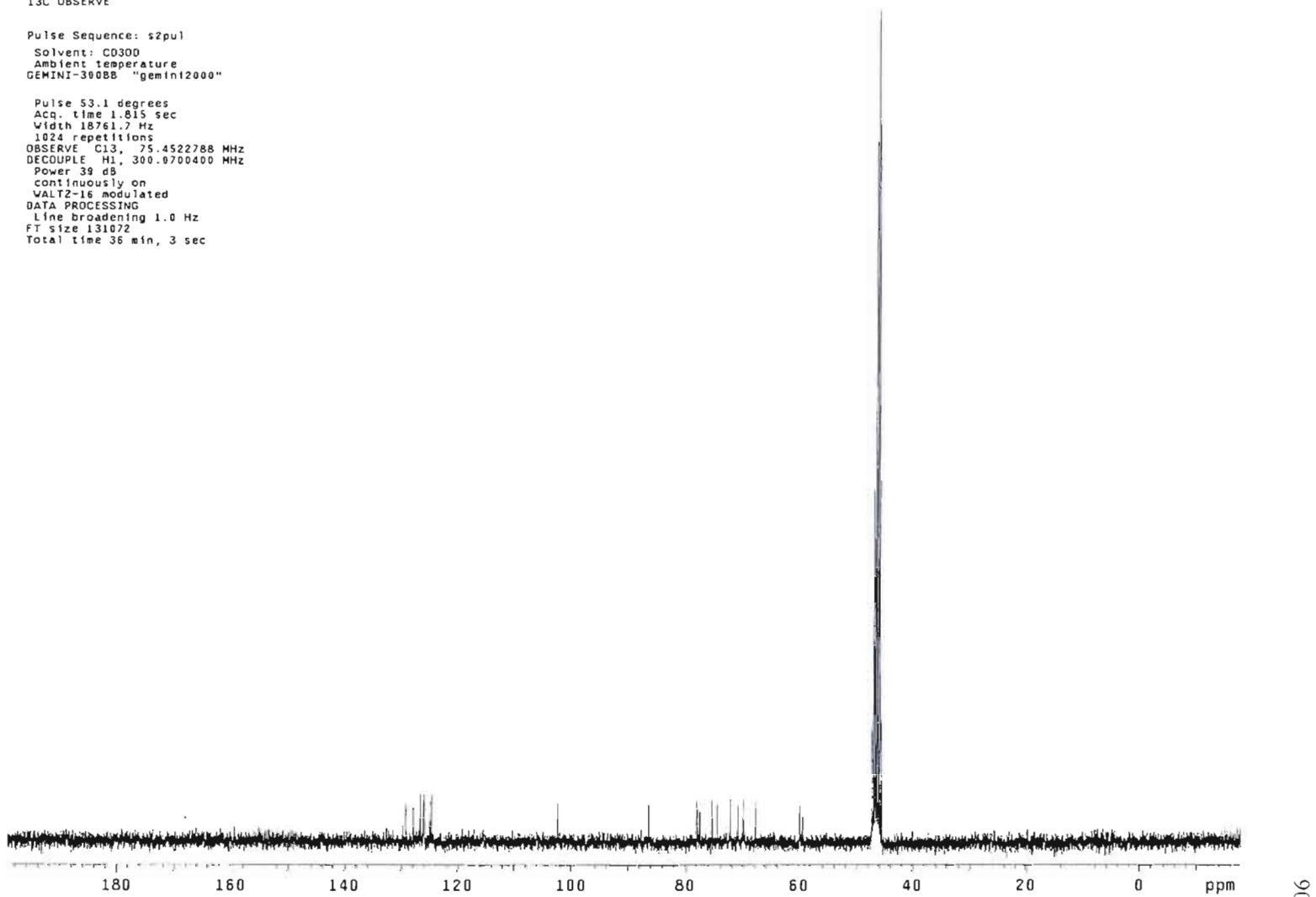


¹³C NMR spectrum (75 MHz, CD₃OD) of compound 6c.

¹³C OBSERVE

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CD300
Ambient temperature
GEMINI-300BB "gemin12000"

Pulse 53.1 degrees
Acq. time 1.815 sec
Width 18761.7 Hz
1024 repetitions
OBSERVE C13, 75.4522788 MHz
DECOUPLE H1, 300.0700400 MHz
Power 39 dB
continuously on
VALT2-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 36 min, 3 sec

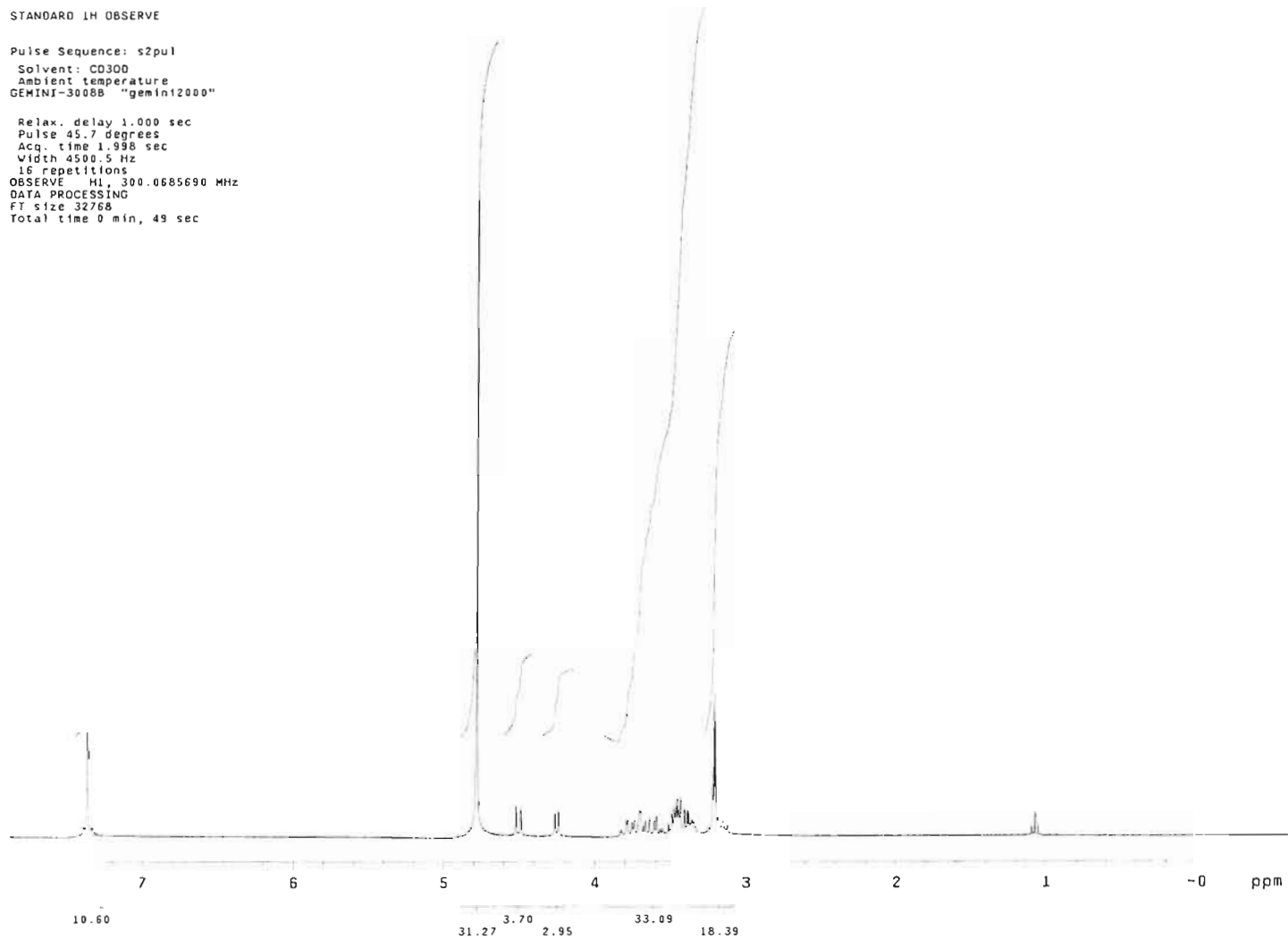


¹H NMR spectrum (300 MHz, CD₃OD) of compound **6d**.

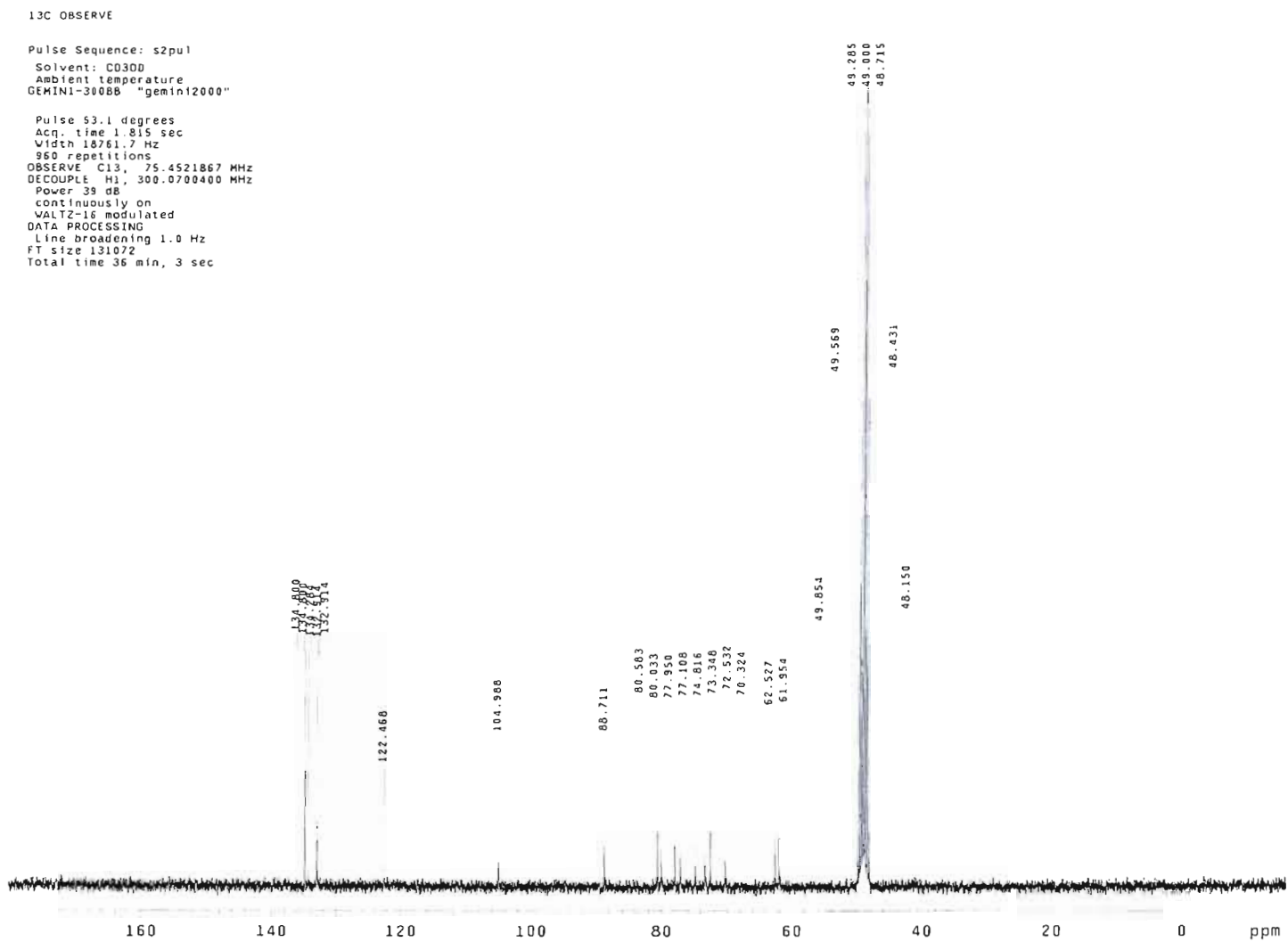
STANDARD 1H OBSERVE

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
GEMINI-30088 "gemin12000"

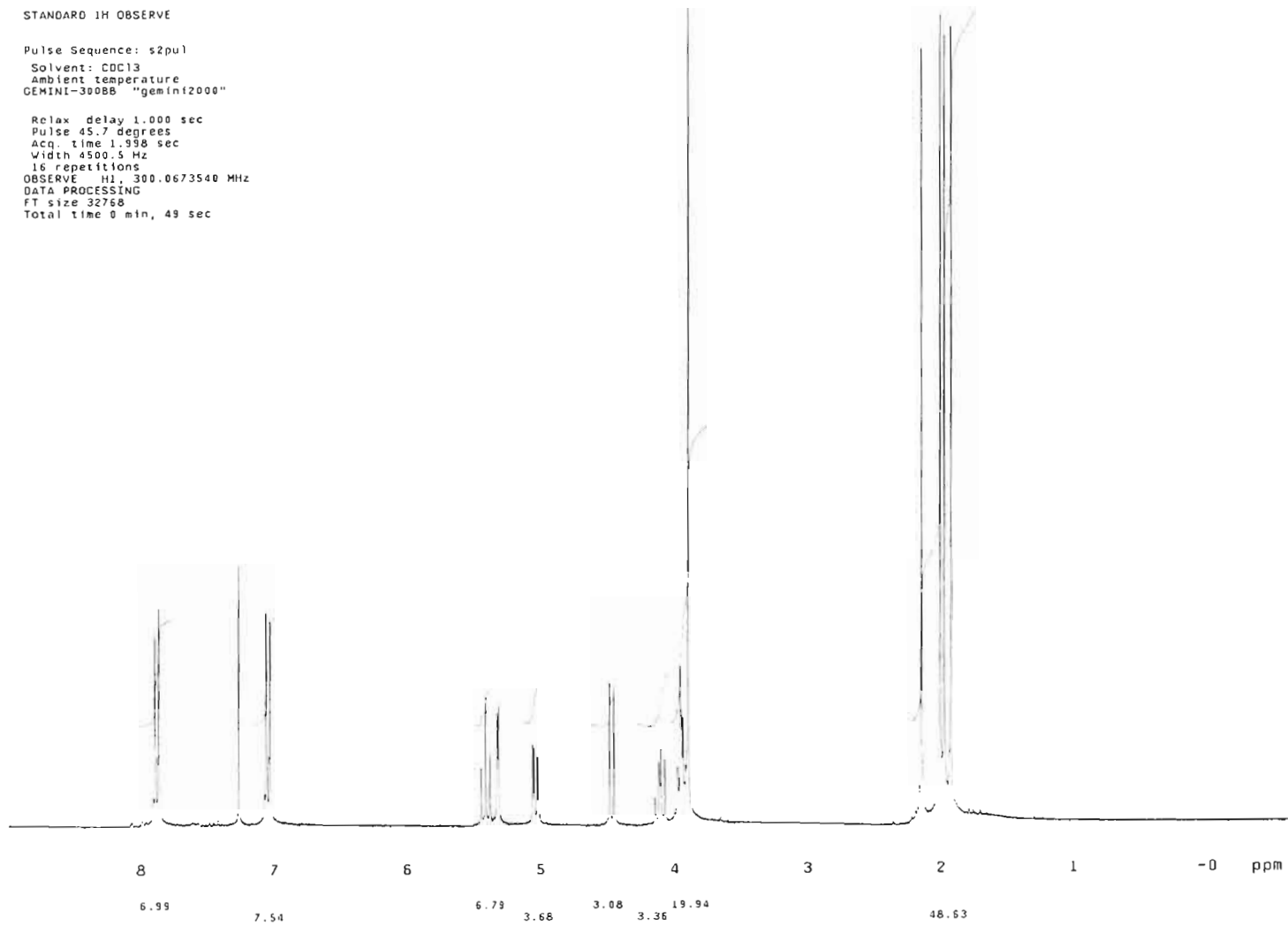
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.7 degrees
Acq. time 1.998 sec
Width 4500.5 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 300.0685690 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min, 49 sec



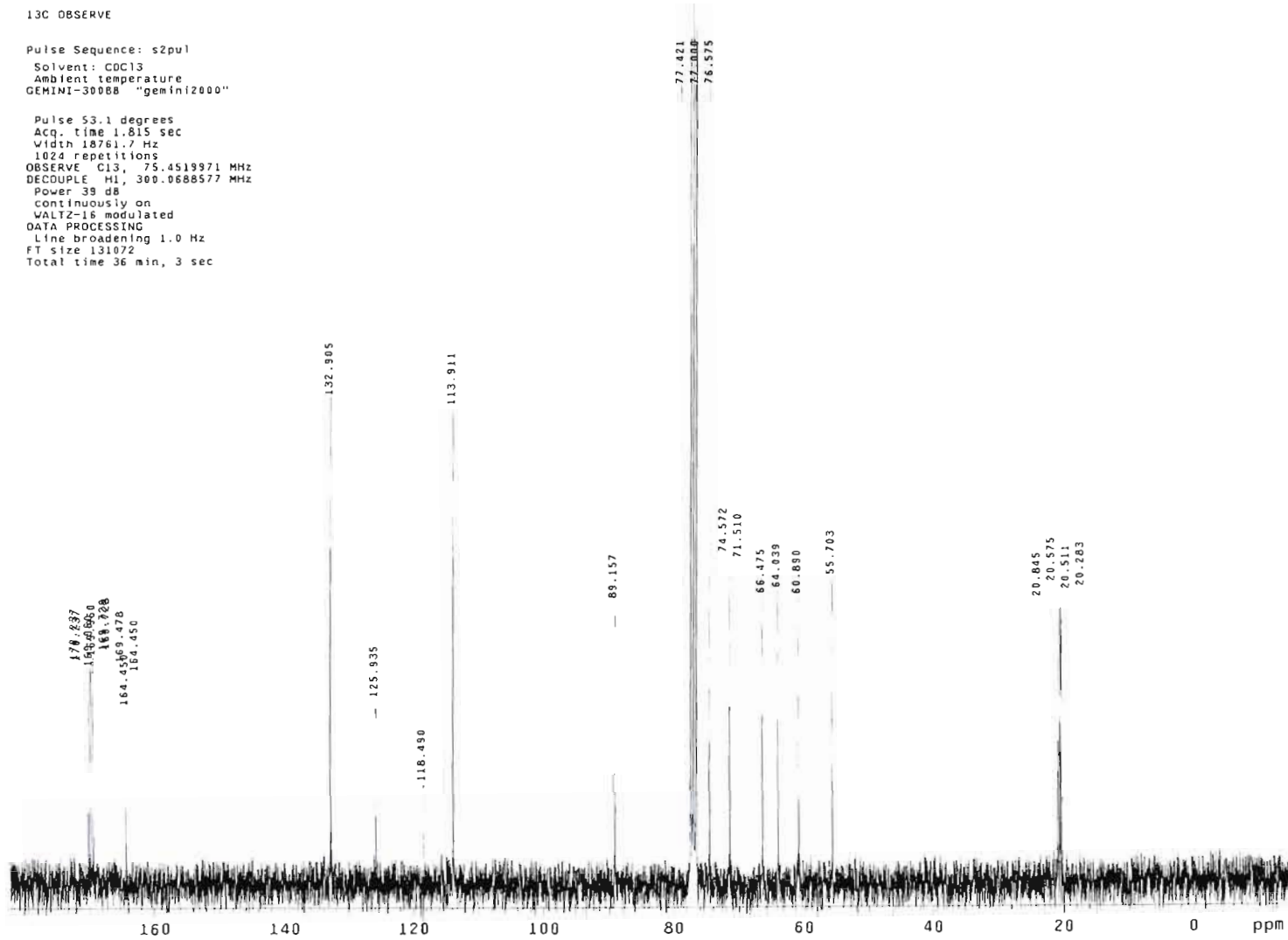
^{13}C NMR spectrum (75 MHz, CD_3OD) of compound **6d**.



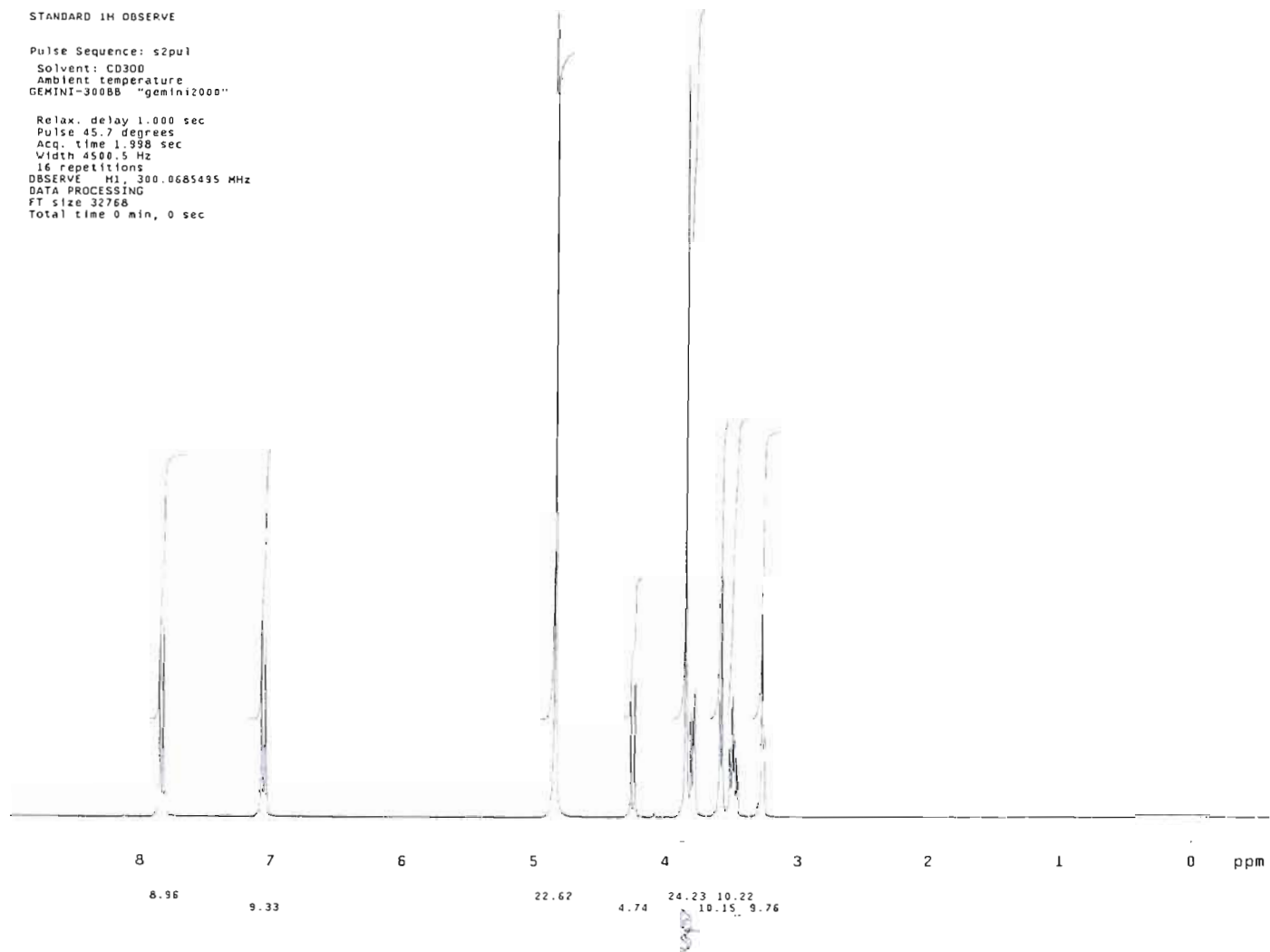
¹H NMR spectrum (300 MHz, CDCl₃) of compound 7b-OAc.



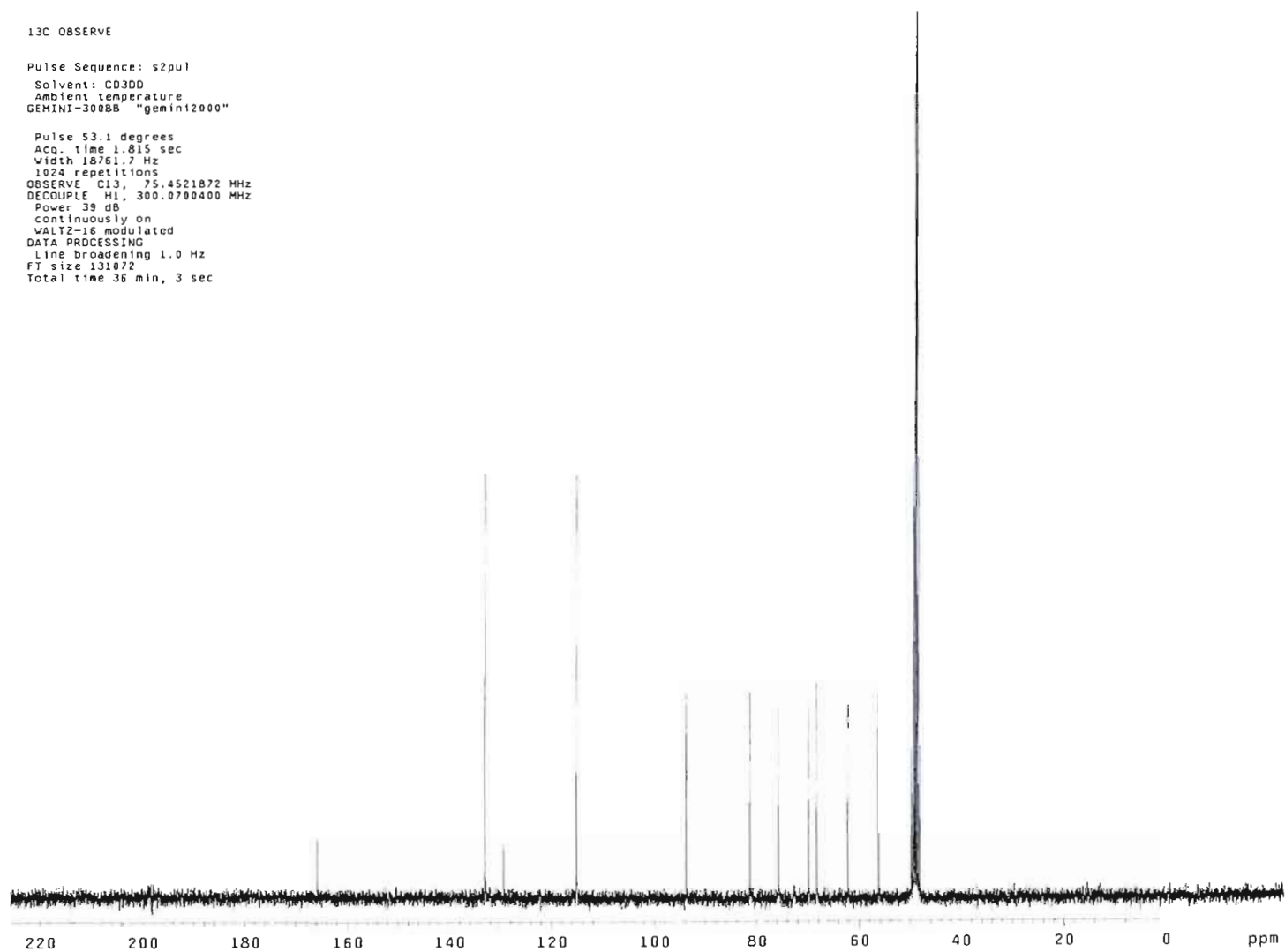
¹³C NMR spectrum (75 MHz, CDCl₃) of compound 7b-OAc.



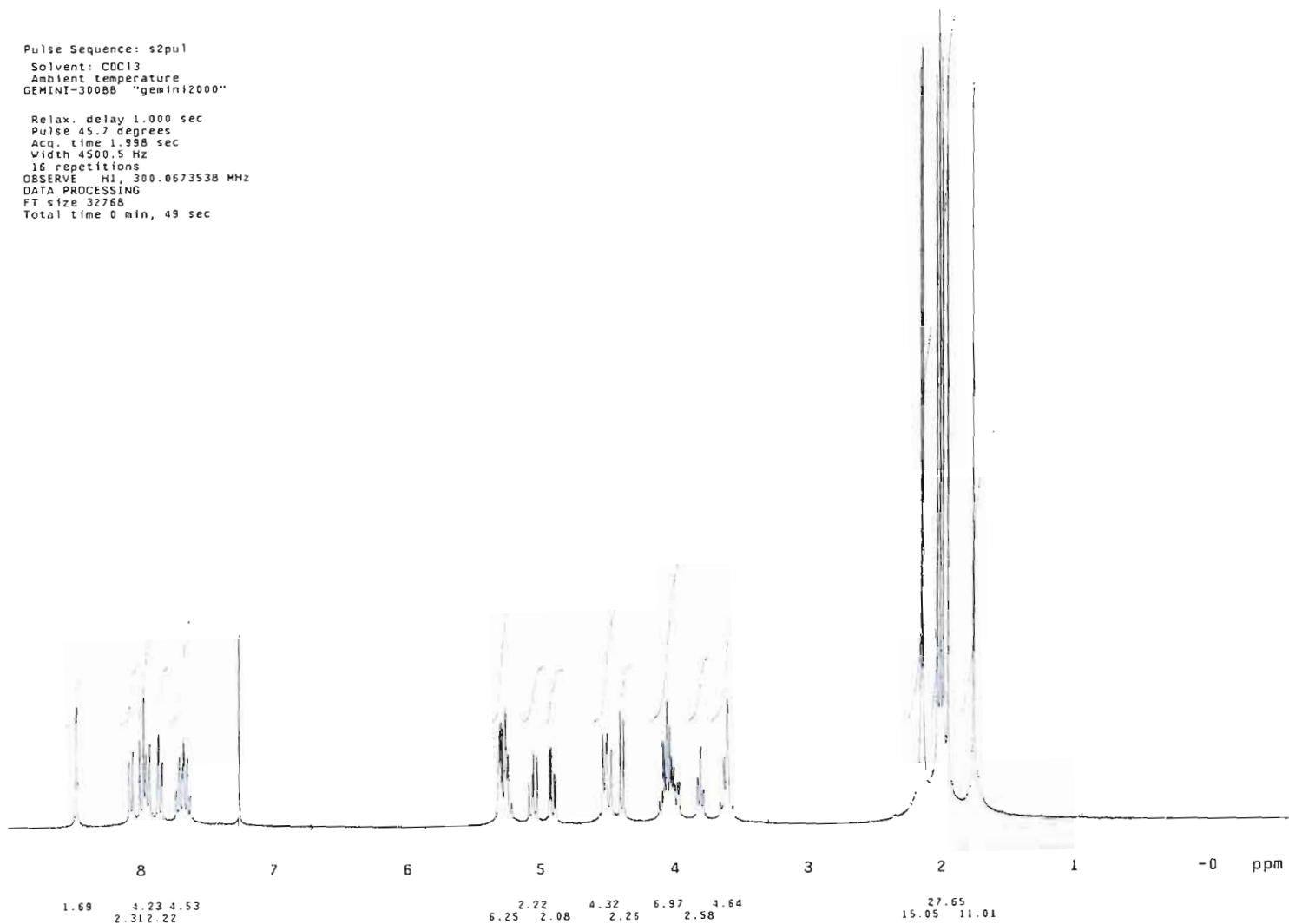
¹H NMR spectrum (300 MHz, CD₃OD) of compound 7b.



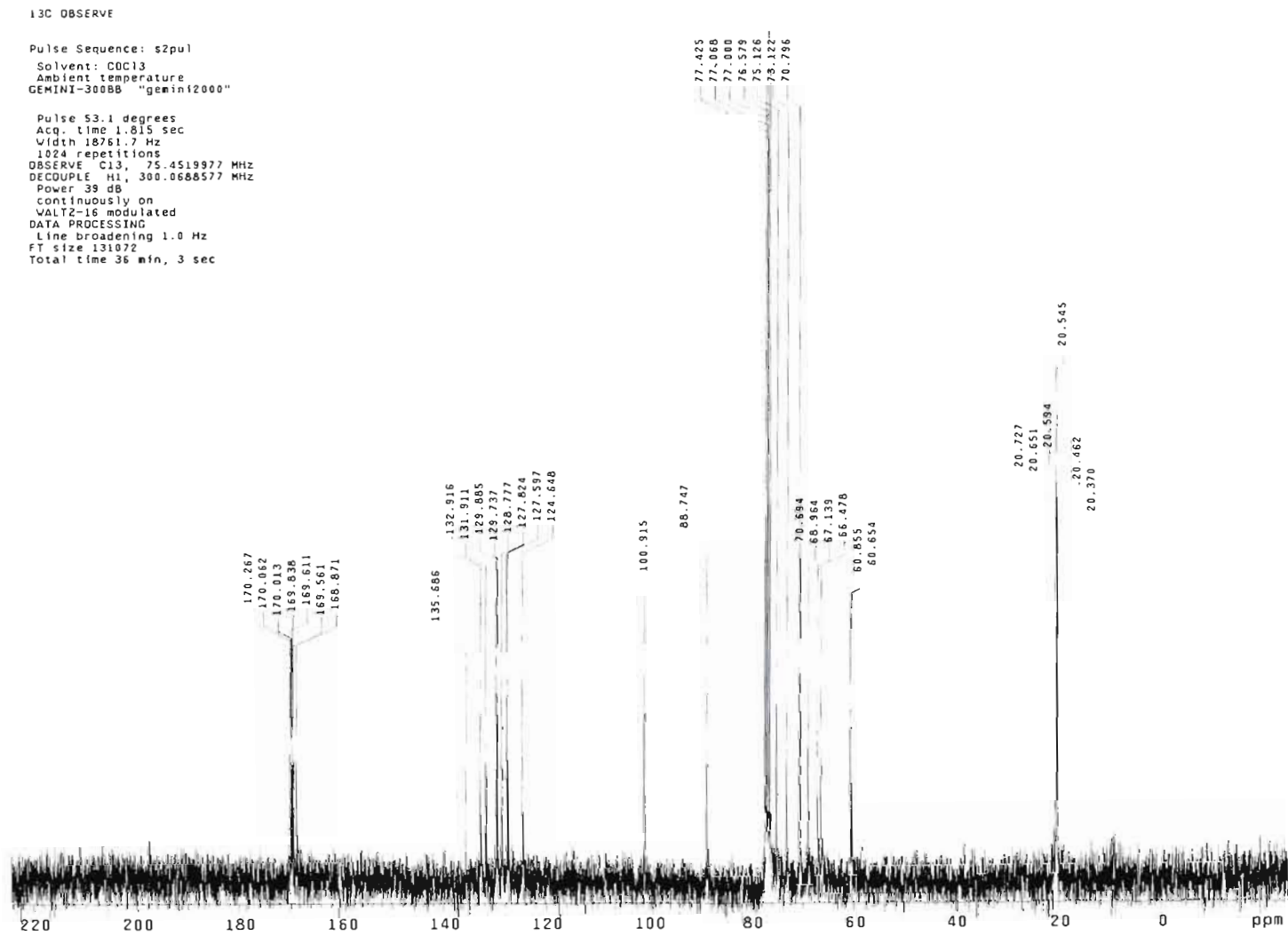
^{13}C NMR spectrum (75 MHz, CD_3OD) of compound 7b.

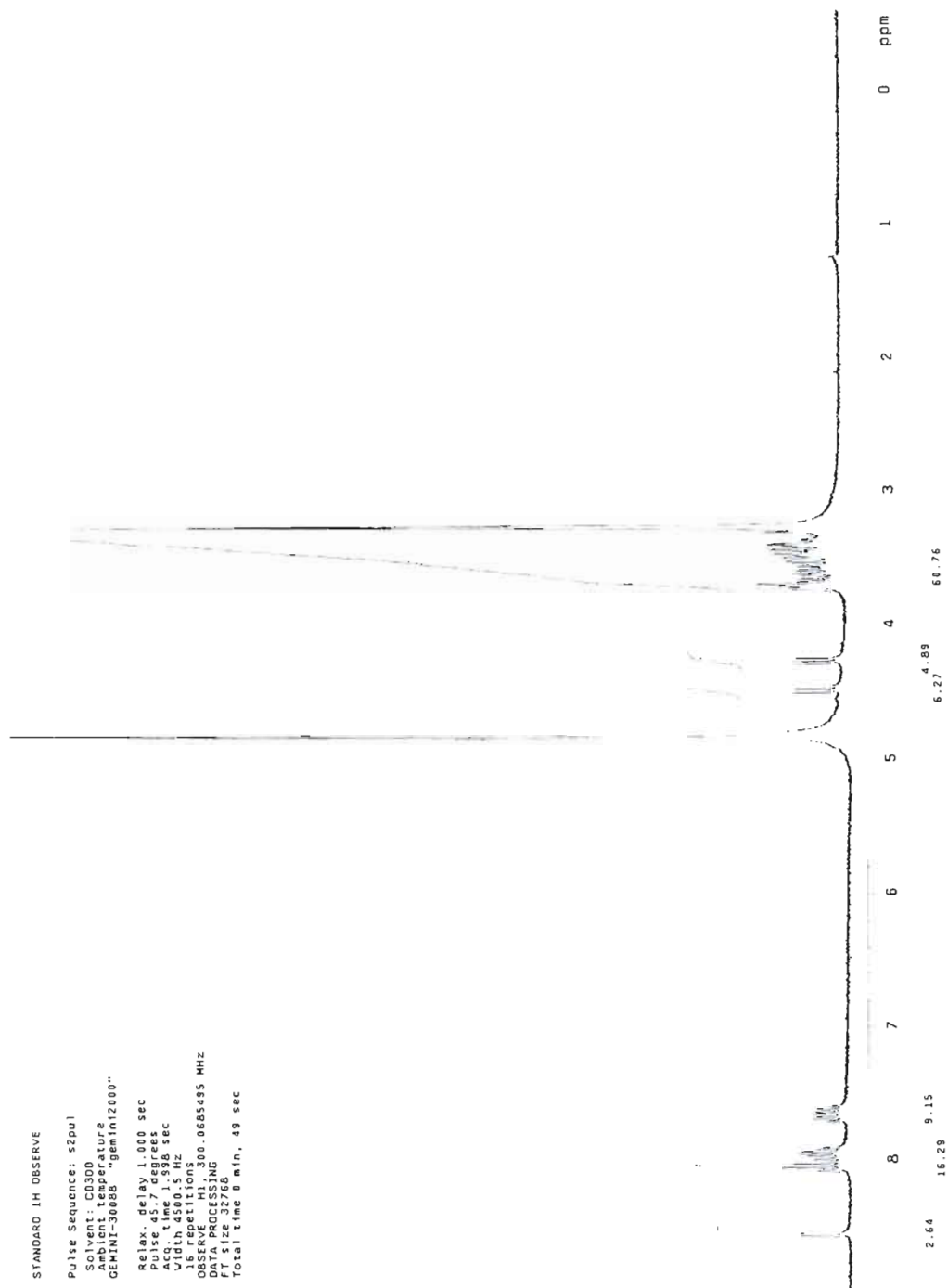


¹H NMR spectrum (300 MHz, CDCl₃) of compound 8c-OAc.

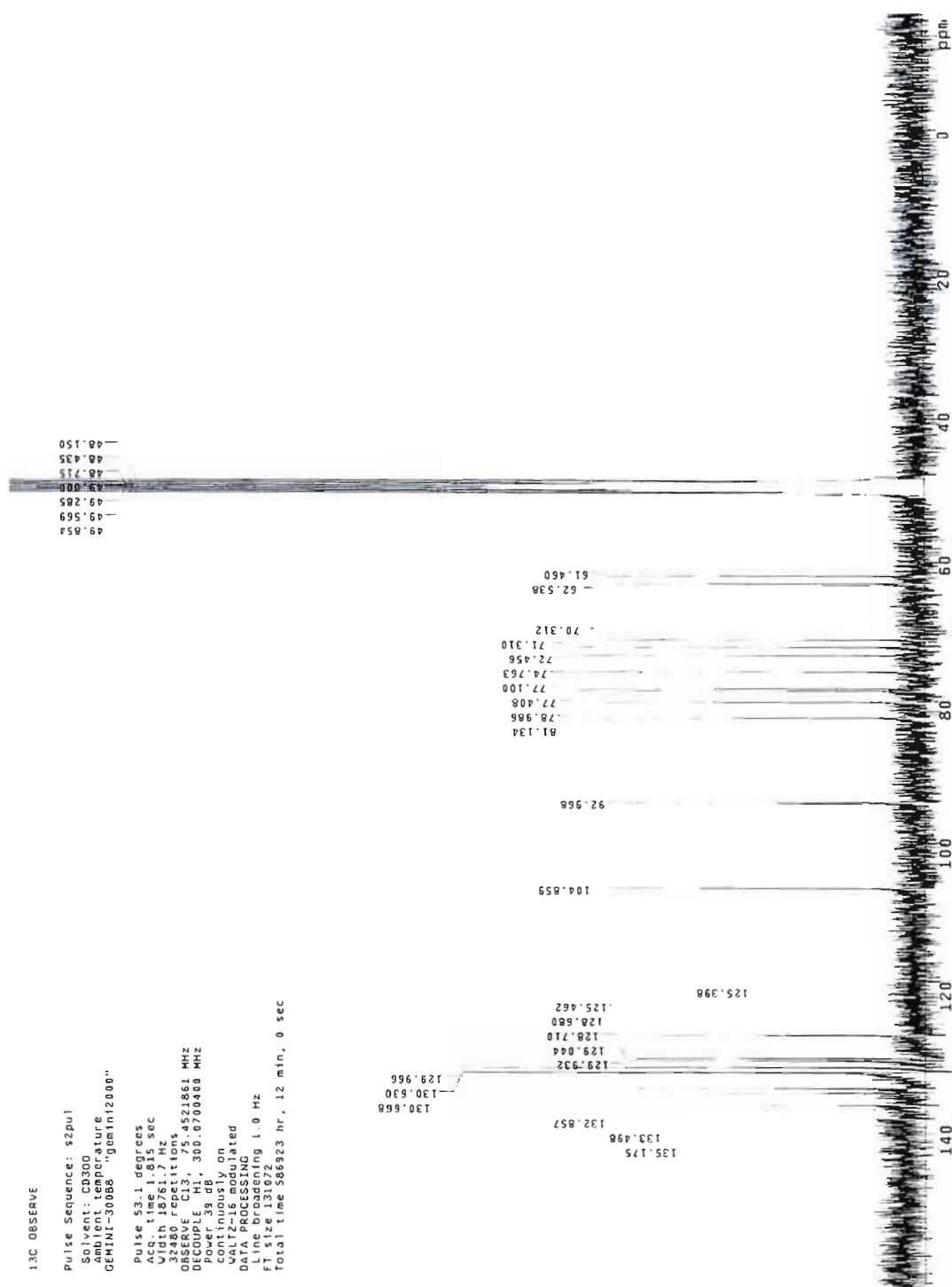


¹³C NMR spectrum (75 MHz, CDCl₃) of compound 8c-OAc.





^1H NMR spectrum (300 MHz, CD_3OD) of compound **8c**.



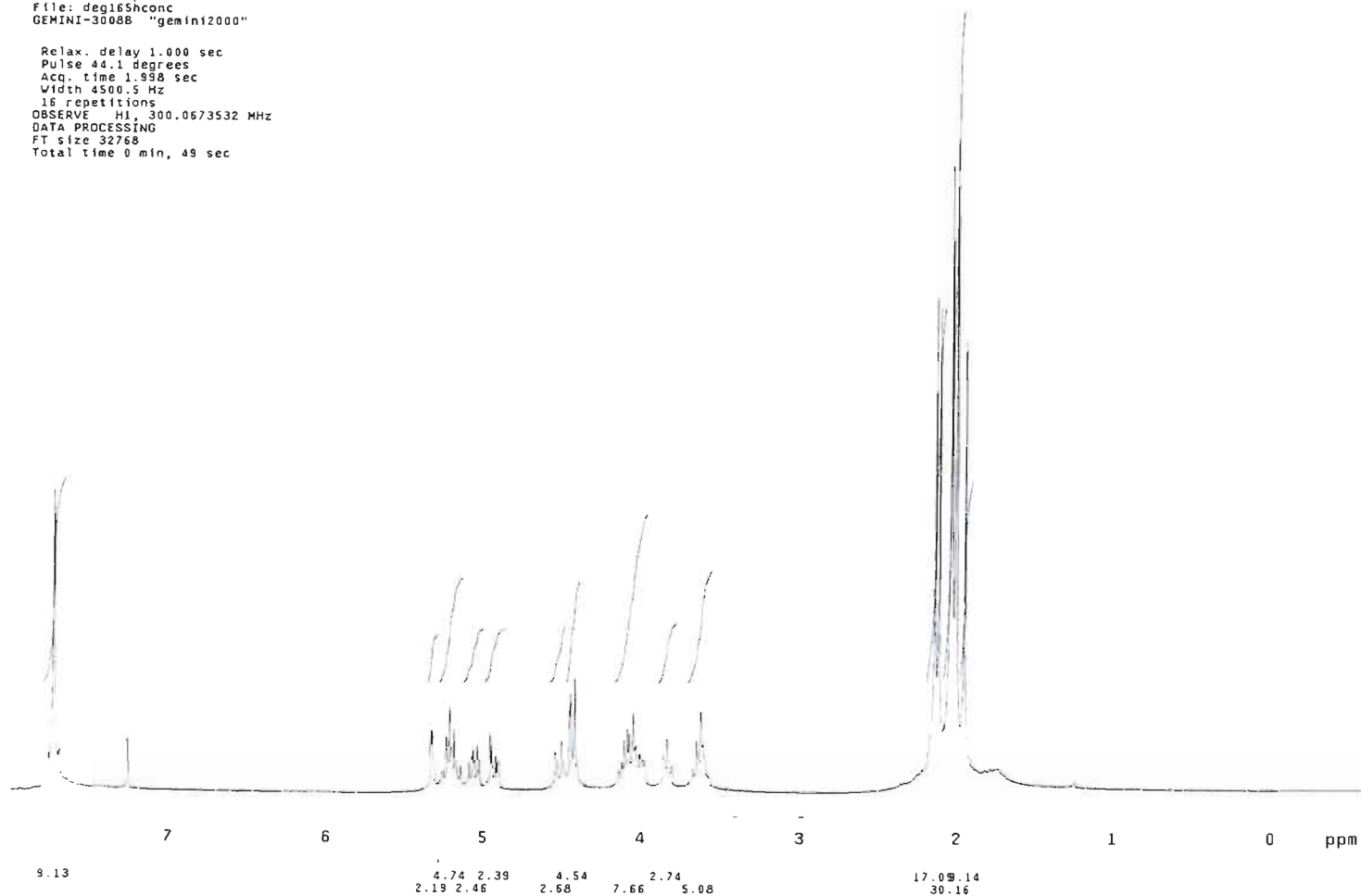
¹³C NMR spectrum (75 MHz, CD₃OD) of compound 8c.

¹H NMR spectrum (300 MHz, CDCl₃) of compound **8d-OAc**.

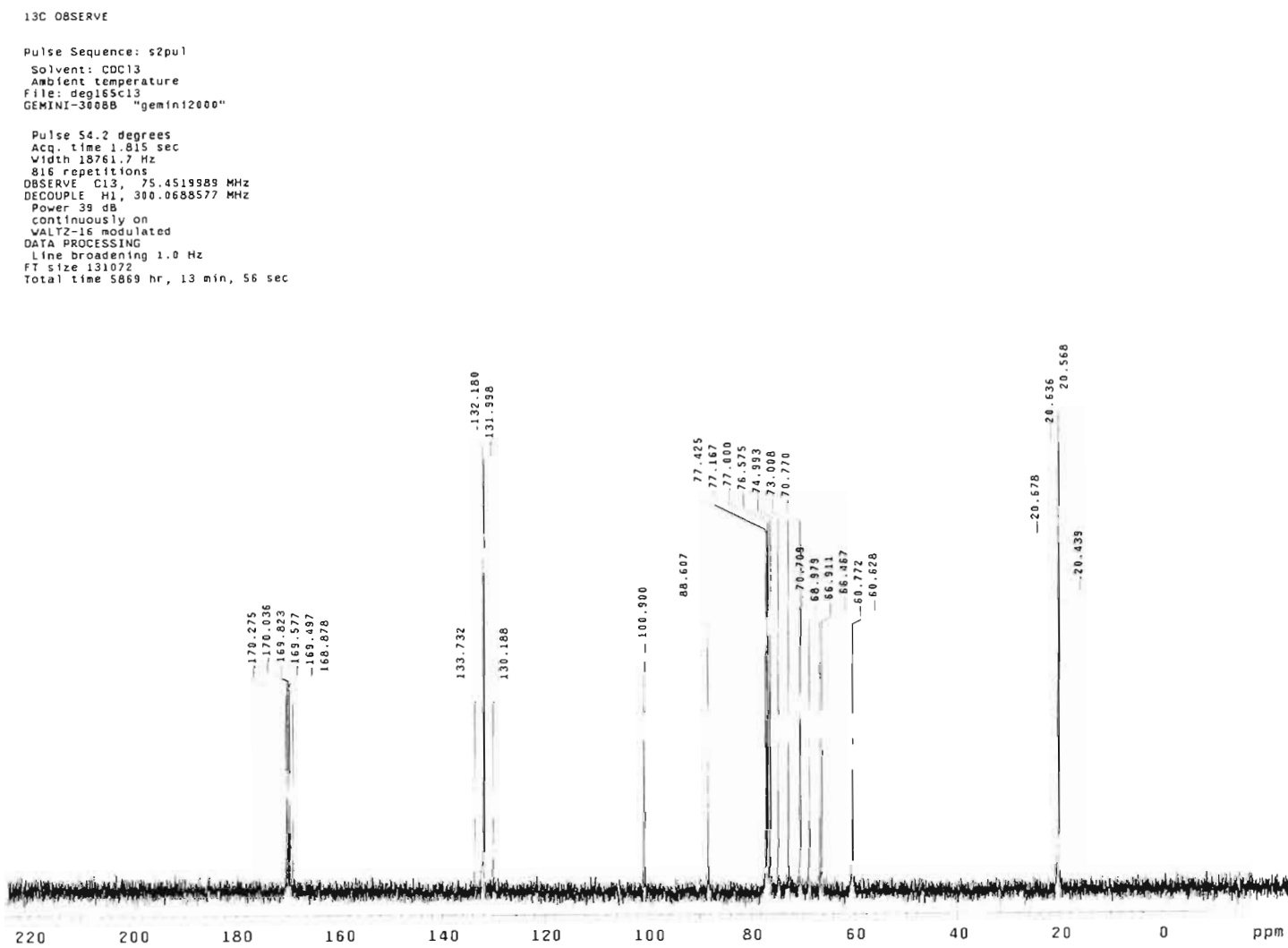
STANDARD 1H OBSERVE

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl₃
Ambient temperature
File: deg165hconc
GEMINI-3008B "gemin12000"

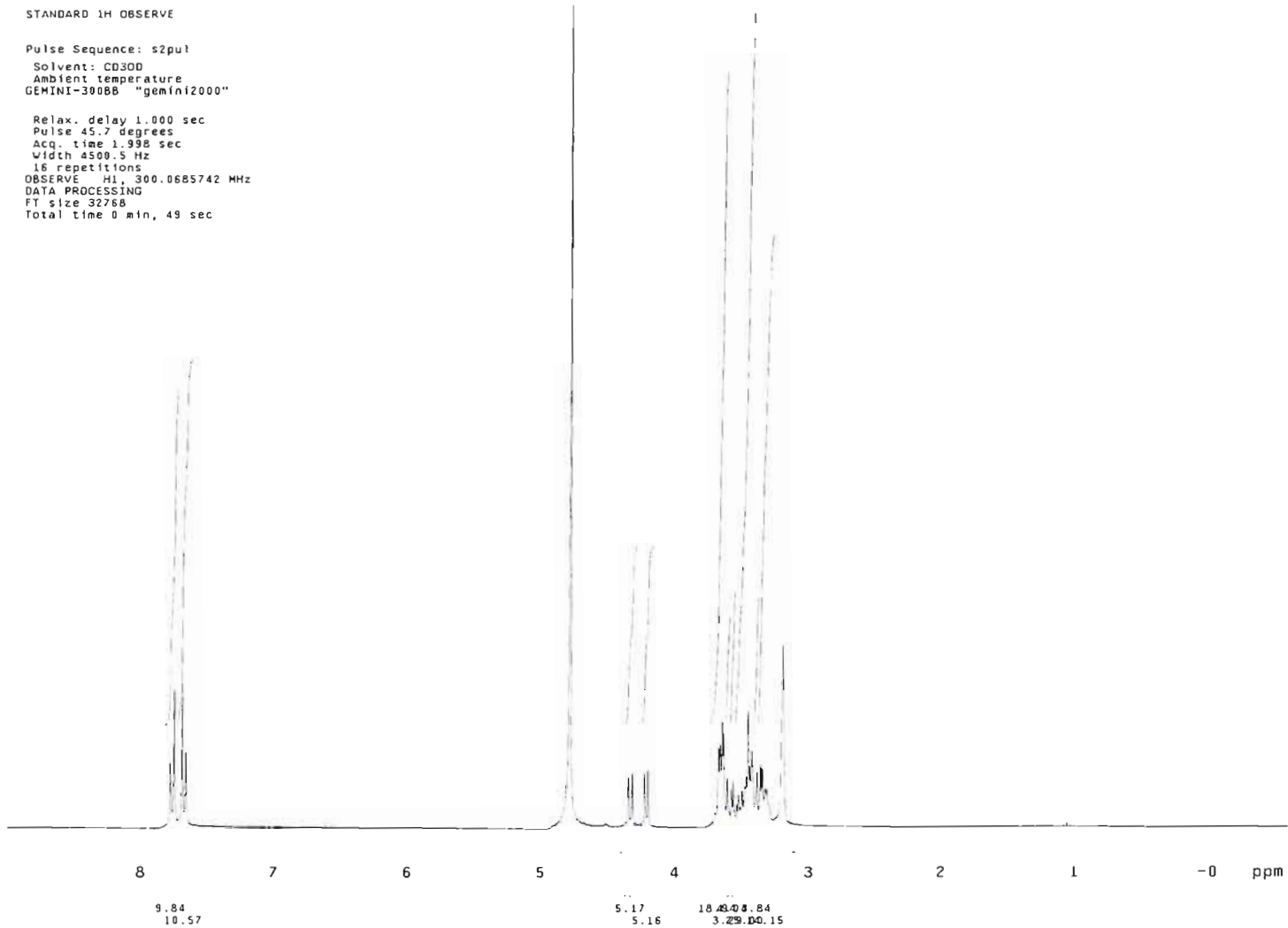
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 44.1 degrees
Acq. time 1.998 sec
Width 4500.5 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 300.0673532 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min, 49 sec



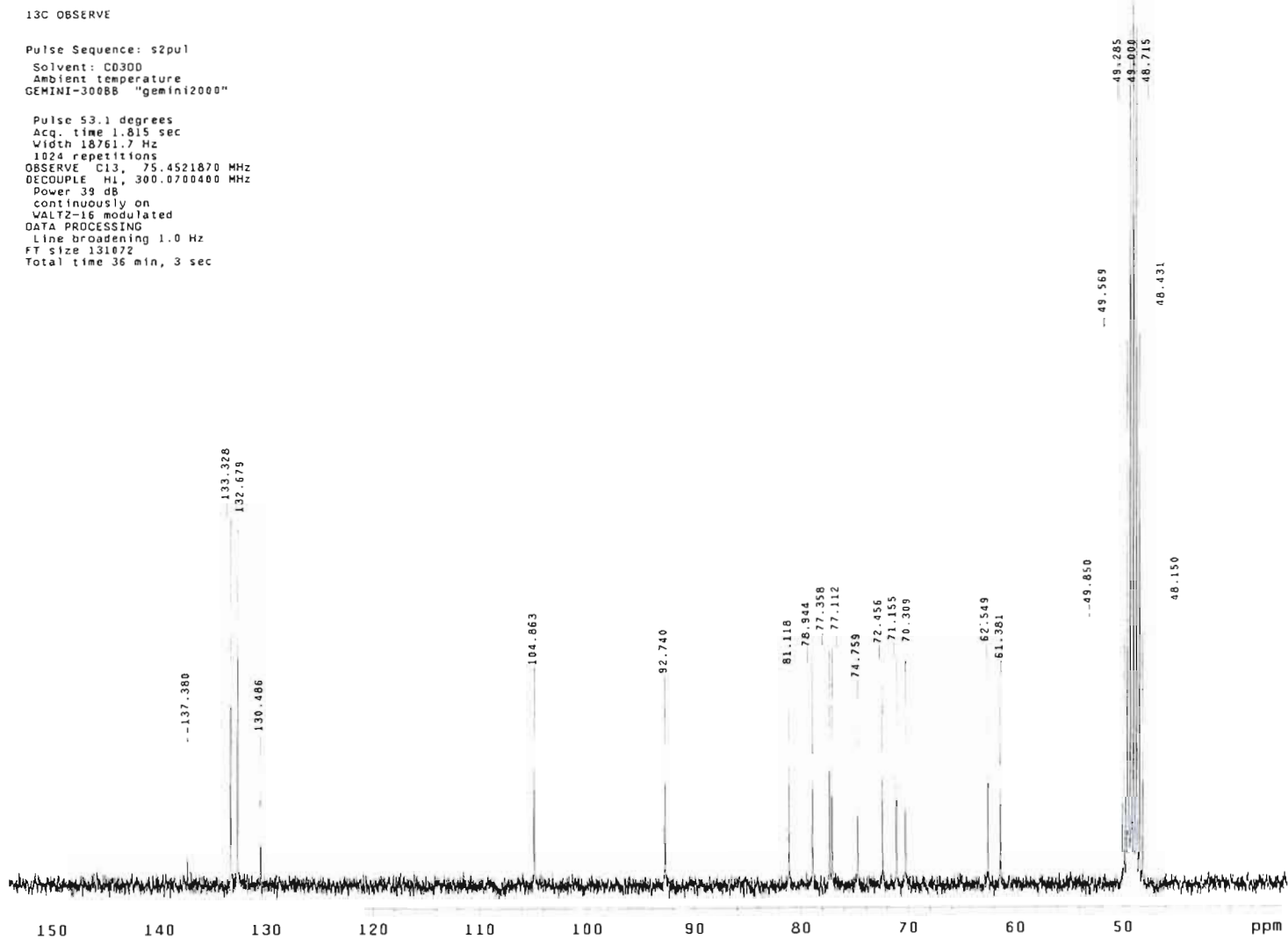
¹³C NMR spectrum (75 MHz, CDCl₃) of compound 8d-OAc.



¹H NMR spectrum (300 MHz, CD₃OD) of compound 8d.



¹³C NMR spectrum (75 MHz, CD₃OD) of compound 8d.



References :

- 1 Cao, S.; Meunier, S. J.; Andersson, F. O.; Letellier, M.; Roy, R. *Tetrahedron Asymmetry*, **1994**, 5, 2303.
- 2 Yde, M.; Bruyne, C. K. *Carbohydr. Res.* **1973**, 26, 227.
- 3 Mehta, S.; Gilbert, M.; Wakarchuk, W. W.; Whitfield, D. M. *Org. Lett.* **2000**, 2, 751.
- 4 Commercially available.
- 5 English, J.; Leffler, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 4324.
- 6 Roy, R.; Tropper, F. D.; Cao, S.; Kim, J. M. *Phase Transfer Catalyst Mechanism, and Syntheses*. ACS Symposium Series. **1997**, 659, 163.
- 7 Commercially available.
- 8 Trincone, A.; Perugino, G.; Rossi, M.; Moracci, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 365.

2.2 Carbohydrate triazoles and isoxazoles as inhibitors of galectins-1 and -3.

**Denis Giguère,^a Ramesh Patnam,^a Marc-André Bellefleur,^a Sachiko Sato,^b
Christian St-Pierre^b and René Roy^{*,a}**

^a *Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Succ. Centre-Ville Montreal, Que., Canada H3C 3P8. Fax: +1 514 987 4054; Tel: +1 4987 3000x2546; E-mail: roy.rene@uqam.ca*

^b *Research Center for Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Université Laval, 2705 boul. Laurier, RC-9700 Sainte-Foy Que., Canada G1V 4G2. Fax: 418 6542715; Tel: 418 654 2705; E-mail: Sachiko.Sato@crchul.ulaval.ca*

Accepté et publié sur le web le 16 mars 2006 pour le périodique *Chemical*

Communications :

Giguère, D.; Patnam, R.; Bellefleur, M.-C.; Sato, S.; St-Pierre, C.; Roy, R. *Chem. Comm.* **2006**, sous presse.

2.2.1 Résumé

Les galectines composent une famille de protéines se liant aux résidus β -D-galactopyranosides dont quatorze membres ont été identifiés chez les mammifères. La galectine-1 est sous forme homodimérique composée de sous-unités d'approximativement 130 acides aminés. La galectine-3 est unique et existe sous forme chimère composée d'un CRD connecté à près de 10 unités répétitives de collagène. Le rôle spécifique des galectines n'est pas très bien défini, mais toutes les galectines ont une très forte modulation de leur expression durant une étape de leur développement préci, sous différentes conditions pathologiques et physiologiques. Les galectines-1 et -3 semblent être impliquées dans le processus d'apoptose cellulaire, ainsi que dans le système immunitaire. La galectine-1 semble aussi être impliqué dans l'infection cellulaire par le VIH. Une inhibition sélective des galectines pourrait mener à des propriétés anti-cancer, anti-inflammatoire ou même anti-VIH. Dans le but de concevoir des glycomimétiques ayant une augmentation d'affinité et de spécificité pour les galectines, des dérivés triazoles et des isoxazoles ont été synthétisés à partir d'alcyne terminaux. Ces hétérocycles non-naturels sont intéressants de par leur stabilité en milieu physiologique et sont facile à synthétiser. La réaction de « click » a été utilisée, où un alcyne terminal est combiné à un azidure en présence d'une quantité catalytique de cuivre(I) pour former les 1,2,3-triazoles substitués en position-1,4. Les isoxazoles sont synthétisés à partir d'un alcyne terminal et d'un oxyde de nitrile. Les hétérocycles synthétisés sont positionnés à différentes positions pour évaluer l'effet de la position de ces hétérocycles sur le saccharide. Tous les composés synthétisés ont été évalués sur deux galectines (1 et 3) avec un essai d'inhibition d'hémagglutination. Possédant une valence de un, les triazoles en position-3' ont donné les meilleurs résultats, pour les deux galectines (propriétés d'inhibitions aussi faible que 1250 μ M). Le cluster C_3 -symétrique a obtenu une propriété d'inhibition de 20 μ M pour la galectine-1, ce qui est 40 fois plus actif que le ligand naturel (lactose).

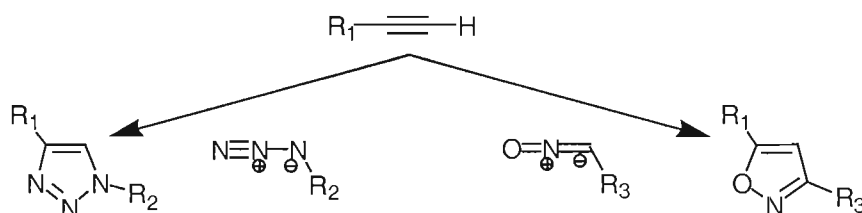
2.2.2 Manuscript

Galactosides and lactosides bearing triazoles or isoxazoles, regiospecifically prepared by [1,3]-dipolar cycloadditions between alkynes, azides or nitrile oxides, provided specific galectin-1 and -3 inhibitors with potencies as low as 20 μ M.

Galectins are a family of cytosolic β -D-galactoside binding proteins of which fourteen members have been identified in mammals.^{1,2} Galectin-1 (Gal-1) is a homodimer composed of subunits of approximately 130 amino acids and each subunit folds as one compact globular domain.¹ Galectin-3 (Gal-3) is quite unique and has one carbohydrate recognition domain (CRD) ending with a collagen-like repeats peptides rich in proline and glycine capable of self association.^{3,4} The roles of the galectin family are not yet clear, but a striking common feature of all galectins is the strong modulation of their expression during development, differentiation stages and under different physiological or pathological conditions.² Recent studies have demonstrated that Gal-3 is involved in colon cancer metastasis,⁵ brain tumor progression,⁶ inhibit metastasis-associated cancer cell adhesion⁷ and may play a key role in innate immunity⁸. Other reports suggest that Gal-3⁹ and Gal-1¹⁰ can regulate apoptosis process.¹¹ It has also been reported that Gal-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells.¹²

Recent developments have been reported in the synthesis of carbohydrate-based triazoles.^{13,14} Medal¹⁵ and Sharpless¹⁶ has solved the problem of 1,4-regioselectivity by using copper(I) catalyst (Scheme 1). This non-concerted cycloaddition is powerful for the synthesis of non-natural heterocycles which are attractive due to their stability.¹⁷ Isoxazoles are also useful on the point of view of their stability under physiological pH and are easy to make. 3,5-Disubstituted

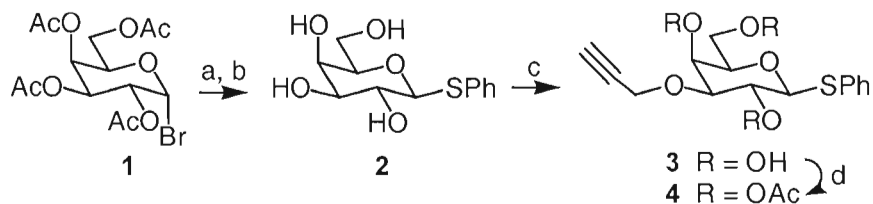
isoxazoles are more difficult to synthesise but new methods have recently been discovered that facilitated their synthesis (Scheme 1).^{16, 18}



Scheme 1

Naturally occurring carbohydrate ligands for galectins have low affinities, are too polar to be used as oral drugs and possess low physiological stabilities due to their acid sensitive glycosidic bonds.¹⁹ A rational design approach for the development of new classes of glycomimetic inhibitors with high affinity, stability and specificity is thus needed. Nilsson *et al.* have explored the 3'-position of lactoside derivatives toward the synthesis of high affinity inhibitors of galectin-3.^{20, 21} Some N-3'-triazole analogs provided high affinity enhancement. However, the lengthy synthetic scheme stimulated the impetus for a shorter synthesis. We thus report herein the straightforward synthesis and evaluation of O-3' triazole and isoxazole analogs of both galactosides and lactosides. This strategy was also applied to the anomeric position.

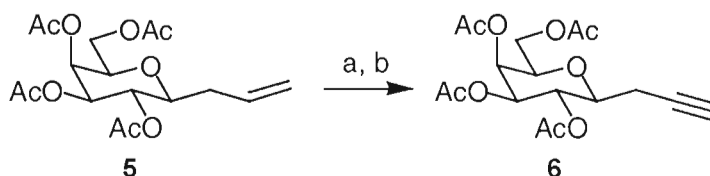
The first alkyne adduct was synthesized from commercially available galactosyl bromide **1** shown in scheme 2. Phase transfer catalyzed nucleophilic displacement²² and de-*O*-acetylation using methanolic sodium methoxide afforded only phenyl 1-thio- β -D-galactoside **2**. Dibutylstannylene acetal formation with dibutyltin oxide²³ and *in situ* reaction with propargyl bromide allowed the regioselective formation of a 3-propynyl ether. Finally, protection under standard conditions provided intermediate **4**.



Reagents and conditions: *a*: HSPh, TBAHS, 1M Na₂CO₃, AcOEt, 75 %. *b*: NaOMe, MeOH quant. *c*: Bu₂SnO, MeOH, then Bu₄NI, propargyl bromide, benzene, 78 %. *d*: Ac₂O, pyridine, 95 %.

Scheme 2

In order to synthesize more hydrolytically stable analogs, β-C-propynyl galactoside **6** was synthesised by ozonolysis of the known β-C-allyl **5**²⁴ followed by the Ohiras's modification of the Seyfert-Gilbert homologation reaction under mildly basic conditions (Scheme 3).



Reagents and conditions: *a*: O₃, Me₂S, MeOH. *b*: (MeO)₂P(O)CHN₂C(O)CH₃, Na₂CO₃, MeOH, then Ac₂O, pyridine, 86 % over 3 steps.

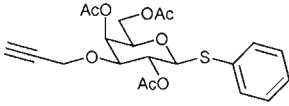
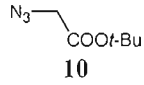
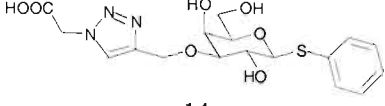
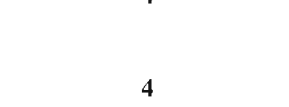
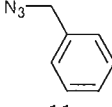
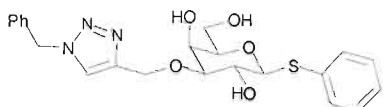
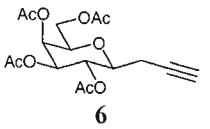
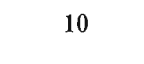
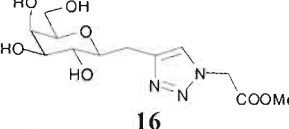
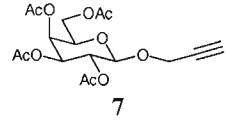
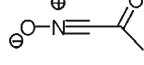
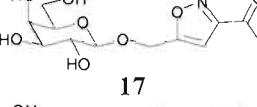
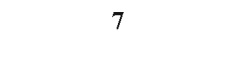
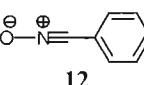
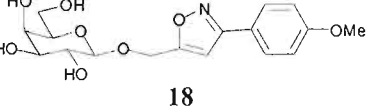
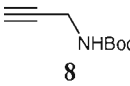
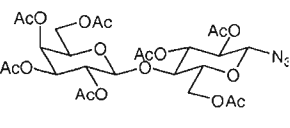
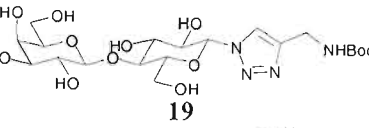
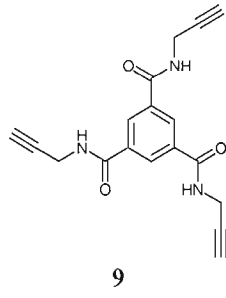

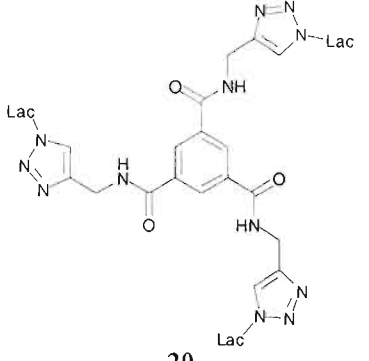
Scheme 3

All terminal alkynes **4** and **6-9** reacted with a panel of azides (**10**, **11** and **13**) or nitriles oxide **12** to give product containing only one regioisomer, summarized in table 1. Alkyne **4** was treated with 2 different azides (**10** and **11**) for the formation of triazole **14** and **15** respectively, designed to maximize binding interactions with

arginine 144.²⁰ Anomeric *C*-propynyl galactoside **6** reacted with azide **10** to form stable triazole **16** while *O*-propynyl galactoside **7** reacted with acetone nitrile oxide generated *in situ* with acetone and ammonium cerium nitrate (CAN)¹⁸ and benzonitrile oxide²⁶ **12** (prepared from benhydroximoyl chloride and pyridine) to provided the corresponding isoxazole heterocycles **17** and **18**, respectively. To synthesize and evaluate anomeric triazoles, lactosyl azide **13** reacted with N-Boc protected propargyl amine **8** to afford triazole **19** in good yield. Finally, C₃-symmetric tris-lactoside **20** was prepared from cycloaddition of **13** with N,N',N''-tripropargyl-1,3,5-carboxamidobenzene **9** (obtained in 82% yield by treatment of 1,3,5-benzenetricarboxylic acid with oxalyl chloride then propargyl amine added dropwise).

All new compounds and control **21** (galactose) and **22** (lactose) were tested by inhibition of hemagglutination assay at a concentration of 1 μ M for both galectins. Assays were performed using red blood cells, type O, fixed with 3% glutaraldehyde-0.0025% NaN₃ in PBS.^{12, 27} Table 2 shows inhibitory properties and relative affinity of ours derivatives toward Gal-1 and -3. The first overall observation was that none of our compounds bound to human Gal-4, indicating that triazole and isoxazole derivatives have better affinities and selectivities for Gal-1 and -3.²⁸ Triazole prepared from a 3-*O*-propynyl spacer showed the most promising family of specific Gal-3 inhibitors (**3** and **14**) among the tested compounds, while **15** did not have any activity, probably due to the large size of the substituent on the triazole. The more stable *C*-galactoside derivative **16** had inhibitory properties of 5 mM against Gal-1 but no inhibition toward Gal-3. Isoxazoles carrying two different substituents and aromatic **18** showed the best results (1250 μ M) having 40 times better affinity than natural analogue **21**. No inhibition was observed against Gal-3 for **15-18**, thus indicating that no anomeric triazoles or isoxazoles had higher inhibitory potency against Gal-3.

Table 1 Synthesis of triazoles and isoxasoles from various alkynes, azides and nitrile oxides.

Entry	Alkynes	Azides or nitrile oxides	Products ^d	Yields (%) ^d
1 ^a				92
2 ^a				97
3 ^a				94
4 ^b				78 ^c
5 ^c				61 ^c
6 ^a				98
7 ^a				83

^a CuI, DIPEA, THF. ^b CAN, Molecular Sieves, DCM. ^c NCS, pyridine, CHCl₃. ^d Yields and products are for cycloadditions and deprotections steps (NaOMe, MeOH, except for entry 1: NaOH/MeOH/H₂O). ^e Based on recover starting material.

Table 2 Inhibitory properties and relative activity for Gal-1 and -3.

Compound No.	Inhibitory properties (mM)		Relative activity ^{a,b}	
	Galectin-1	Galectin-3	Galectin-1	Galectin-3
3	>5	1.25	>10	40
14	1.25	5	40	10
15	>5	>5	>10	>10
16	5	>5	10	>10
17	2.5	>5	20	>10
18	1.25	>5	40	>10
19	not tested			
20	0.02	0.25	40 (13.3) ^b	3.2 (1.1) ^b
21 gal	50	50	1	1
22 lac ^c	0.8	0.8	1	1

^a Compounds **3** and **14-18** were compared to reference galactose **21** and compound **20** were compared to lactose **22**. ^b Number in parentheses express the relative potency of each lactose unit in the trivalent derivative compared to lactose. ^c Lactose is ~50x better than Gal.

Unfortunately, anomeric triazole **19** wasn't soluble enough for testing even with 5% DMSO added. The C₃-symmetrical lactoside **20** was design for the reason described below. First, studies have demonstrated that some galectins are dimeric and create soluble network in the presence of a multivalent ligand.²⁹ Thus, glycoclusters may increase affinity enhancement due to multivalent effects and formation of soluble cross-linked lattices. Glycoclusters with a valency of three were synthesized because it was previously demonstrated that C₃-symmetrical saccharide had good affinity with galectins³⁰ and symmetrical analogue provided simpler analysis due to their intrinsic symmetry. As expected, trivalent **20** provided inhibitory properties of 20 μ M against Gal-1 for relative affinity of 40 that are 13 times better for each lactose units. Suprisingly, the multivalent effect did not exist for Gal-3 with inhibitory

properties of 250 μM and relative affinity of 3.2 which is almost one lactose unit by galectins.

In conclusion, isoxazoles and triazoles have potential as Gal-1 selective inhibitors over other galectins and compared well with known inhibitors.^{20, 21, 31-33} The best inhibitors among the tested series were triazole **14** and anomeric isoxazole **18** with inhibitory properties of 1250 μM for both inhibitors. Simple 3-propynyl galactoside **3** was a good candidate against Gal-3 and is a potential lead structure for the further development of novel inhibitors. Finally, we developed a potent trivalent inhibitor (**20**) of galectins with inhibitory properties of 20 μM . It is probable that formation of a C_3 -symmetric analogs of **15** or **18** would provide even better results. Although the above compounds are notably less efficient than those described by Nilsson et al.^{20, 21} we used inhibition of hemagglutination assays known to require higher concentration.

This work was supported from Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for a Canadian Research Chair in Therapeutic Chemistry (RR) and from Canadian Institutes for Health Research (SS).

2.2.3 References

- 1 S. H. Barondes, D. N. Cooper, M. A. Gitt and H. Leffler, *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, 20807.
- 2 L. Chiariotti, P. Salvatore, R. Frunzio and C.B. Bruni, *Glycoconjugate J.*, 2004, **19**, 441; H. Horrie, *Curr. Drug Targets*. 2005, **6**, 373.
- 3 D. N. W. Cooper and S. H. Barondes, *Glycobiology*, 1999, **9**, 979.
- 4 J. Hirabayashi and K. Kasai, *Glycobiology*, 1993, **3**, 297.
- 5 R. S. Bresalier, N. Mazurek, L. R. Stenberg, J. C. Byrd, C. K. Yunker, P. Nangia-Makker and A. Raz, *Gastroenterology*, 1998, **115**, 287.
- 6 B. N. Stillman, P. S. Mischel and L. G. Baum, *Brain Pathol.* 2005, **15**, 124.
- 7 J. Zou, V. V. Glinsky, L. A. Landon, L. Matthews and S. L. Deutscher, *Carcinogenesis*, 2005, **26**, 309.
- 8 S. Sato and J. Nieminem, *Glycoconjugate J.*, 2004, **19**, 441; F. T. Liu, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 2005, **136**, 385.
- 9 S. Califice, V. Castronovo and F. Van Den Brule, *Int. J. Oncol.*, 2004, **25**, 983; S. Nakahara, N. Oka and A. Raz, *Apoptosis*, 2005, **10**, 267.
- 10 N. L. Perllo, K. E. Pace, J. J. Seilhamer and L. G. Baum, *Nature*, 1995, **378**, 736; T. Szoke, K. Kayser, J. D. Baumhakel, I. Trojan, J. Furak, L. Tislaviez, A. Horvath, K. Szluha, H.-J. Gabius and S. André, *Oncology*, 2005, **69**, 167.
- 11 D. K. Hsu and F. T. Liu, *Glycoconj. J.* 2004, **19**, 507; J. D. Hermendes and L. G. Baum, *Glycobiology*, 2002, **12**, 127R.
- 12 M. Ouellet, S. Mercier, I. Pelletier, S. Bounou, J. Roy, J. Hirabayashi, S. Sato and M. J. Tremblay, *J. Immunol.* 2005, **174**, 4120.
- 13 J. A. F. Joosten, N. T. H. Tholen, F. A. E. Maate, A. J. Brouwer, G. W. van Esse, D. T. S. Rijkers, R. M. Liskamp and R. J. Pieters, *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, 3182; S. Hotha and S. Kashyap, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 364.

- 14 Y. Gao, A. Eguchi, K. Kakehi and Y. C. Lee, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 6151.
- 15 C. M. Tornøe, C. Christensen and M. Meldal, *J. Org. Chem.* 2002, **67**, 3057.
- 16 F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless and V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 210.
- 17 H. Wamho, *In Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; A. R. Katritzky, C. W and R. S. Potts, Pergamon: Oxford, 1984, **5**, 669.
- 18 K.-I. Itoh, S. Takahashi, T. Ueki, T. Sugiyama, T. Takahashi and C. A. Horiuchi, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 7035.
- 19 H. Leffler and S. H. Barondes, *J. Biol. Chem.*, 1986, **22**, 10119.
- 20 P. Sörme, Y. Qian, P.-G. Nyholm, H. Leffler and U. J. Nilsson, *ChemBioChem*, 2002, **3**, 183; P. Sörme, P. Arnoux, B. Kahl-Knutsson, H. Leffler, J. M. Rini and U. J. Nilsson, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**, 1747; I. Cumpste, A. Sundin, H. Leffler and U. J. Nilsson, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, **44**, 5110.
- 21 B. A. Salameh, H. Leffler and U. J. Nilsson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, **15**, 3344.
- 22 R. Roy, F. D. Tropper, S. Cao and J. M. Kim, Phase Transfer Catalyst Mechanism and Syntheses. ACS Symposium Series. 1997, **659**, 163.
- 23 T. B. Grindley, *Synthetic oligosaccharides*, 1994, ACS Symposium Series **560**, 51.
- 24 T. Uchiyama, V. P. Vassilev, T. Kajimoto, W. Wong, H. Huang, C.-C. Lin and C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, **117**, 5393.
- 25 S. Ohira, *Synthetic Comm.* 1989, **19**, 561.
- 26 F. M. Hausser and X. Hu, *Org. Lett.* 2002, **4**, 977.
- 27 W. T. Butler, *J. Immunol.* 1963, **90**, 663.
- 28 Concentration at 0.5 μ M for galectin-4.

- 29 T. K. Dam, H.-J. Gabius, S. André, H. Kaltner, M. Lensch and C. F. Brewer, *Biochem.* 2005, **44**, 12564; N. Ahmad, H.-J. Gabius, S. Sabesan, S. Oscarson and C. F. Brewer, *Glycobiology*, 2004, **14**, 817.
- 30 S. André, B. Liu, H.-J. Gabius and R. Roy, *Org. Biomol. Chem.* 2003, **1**, 3909.
- 31 R. T. Lee, Y. Ichikawa, H. J. Allen and Y. C. Lee, *J. Biol. Chem.* 1990, **265**, 7874.
- 32 H. Ahmed, H. J. Allen, A. Sharma and K. L. Matta, *Biochemistry* 1990, **29**, 5315.
- 33 D. Giguère, S. Sato, C. St-Pierre, S. Sirois and R. Roy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 1668.

2.2.4 Supporting Information

Materials and methods:

All reactions involving water-sensitive chemicals were carried out in flame-dried glassware with magnetic stirring under a nitrogen atmosphere. Anhydrous DCM was distilled from CaH_2 and anhydrous THF were distilled from Na/K prior to use. All non-aqueous reactions were carried out under anhydrous conditions within a nitrogen atmosphere in distilled solvents. All other solvents and reagents were used as received. TLC was performed on aluminium plates (coated with silica gel 60 F₂₅₄) with detection by UV or by coloration with a molybdate ammonium in acid solution. Column chromatography were performed on silica gel (230-400 mesh) with the indicated eluent. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 300 (75) MHz with a Variant apparatus. Chemical shifts (ppm) are reported relative to CHCl_3 (7.27) or D_2O or CD_3OD as internal standard. Optical rotations were measured on a Polarimeter JASCO P-1000, melting point on a Fisher-Johns Point Apparatus and ESI-MS analyses were carried out on a MICROMASS Quattro LC.

Typical procedure for triazole synthesis:

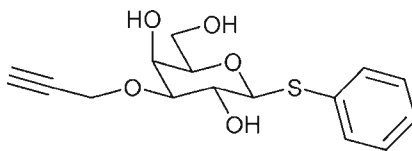
Carbohydrate containing alkyne (0.302 mmol) dissolved in THF (0.1 M) and CuI (0.03 mmol), DIPEA (0.606 mmol) and azide (0.332 mmol) were added and stirred, at room temperature. The green solution was stirred until disappearance of the starting material (maximum 3 hours) and then evaporated under reduced pressure, dissolved with ethyl acetate and filtered through a pad of celite. The organic solution was washed with aqueous HCl (10%), dried over sodium sulfate, filtered, evaporated

under reduced pressure and purified using flash chromatography with a mixture of ethyl acetate and hexane as eluent (or DCM and MeOH).

Typical procedure for de-*O*-acetylation :

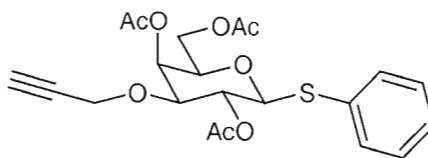
The acetyl-protected glycoside (0.1 mmol) was dissolved into methanol (2 mL), to which was added a catalytic amount of sodium methoxide. The solution was stirred at room temperature until disappearance of the starting material (usually less than 3 hours). After neutralization of sodium methoxide with Amberlite IR-120 (H⁺) resin, the solution was filtered and removal of the methanol under reduced pressure afforded the fully deprotected glycoside.

Spectroscopic data:

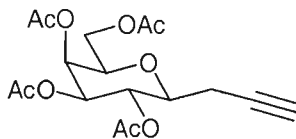


Phenyl 3-*O*-(1-propynyl)-1-thio-β-D-galactopyranosyl **3**: Phenyl 1-thio-β-D-galactopyranoside **2** (0.354g, 1.29 mmol) was dissolved in MeOH (8 mL) and the mixture was heated under reflux for 2 hours, then concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was diluted with benzene (8 mL), Bu₄NI (0.29 g, 0.79 mmol) and propargyl bromide (1.07 mL, 9.6 mmol) were added to the mixture. The reaction was stirred at 60°C for 20 hours, then filtered through a celica path. The resulting organic solution was concentrated under reduced pressure and purified by flash silica gel column chromatography and afforded **3** (0.314g, 78 %) as a yellow oil; $[\alpha]_D^{20}$ -33.9 (c 0.26 in MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.42-7.39 (2H,

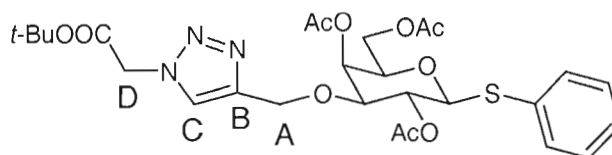
m, H_{AR}), 7.28-7.19 (3H, m, H_{AR}), 4.62 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1), 4.19 (2H, s, $\underline{CH_2CCH}$), 4.08 (1H, dd, $J = 1.3$ Hz, H-4), 3.61-3.47 (5H, m, H-2, H-3, H-5, H-6a, H-6b), 2.73 (1H, t, $J = 1.4$ Hz, $\underline{CH_2CCH}$); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ 132.6, 131.3, 129.4, 128.0 (4 C_{AR}), 88.0 (C-1), 81.0 (C-3), 79.5 ($\underline{CH_2CCH}$), 78.8 ($\underline{CH_2CCH}$), 76.2 (C-5), 68.0 (C-4), 65.2 (C-2), 61.0 (C-6), 56.5 ($\underline{OCH_2CCH}$); ESI-MS calcd for $C_{15}H_{18}O_5S + (Na^+)$: 333.1; found: 333.3.



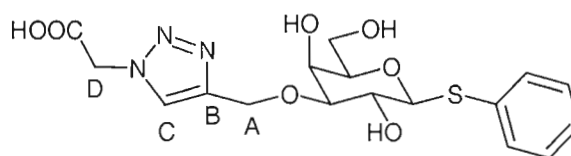
Phenyl 3-*O*-(1-propyn)-2,4,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl **4** : To a mixture of **3** (1g, 2.29 mmol) dissolved in pyridine (25 mL) at 0°C was added dropwise acetic anhydride (5 mL) and the mixture was stirred over night at room temperature. At the morning, pieces of ice and ethyl acetate is added to the mixture and the aqueous layer is washed with ethyl acetate. The combine organic layer were washed with a solution of $NaHCO_3$, brine, water, dried over Na_2SO_4 , filtered, concentrated under reduced pressure and purified by flash silica gel column chromatography to afforded **4** (0.949g, 95%) as white solid; $[\alpha]_D^{20} +36.0$ (c 0.11 in DCM); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.54-7.50 (2H, m, H_{AR}), 7.32-7.27 (3H, m, H_{AR}), 5.43 (1H, dd, $J = 3.3$ Hz, H-4), 5.11 (1H, dd, $J = 9.6$ Hz, H-2), 4.70 (1H, d, $J = 9.89$ Hz, H-1), 4.19-4.16 (4H, m, H-3, H-6a, $\underline{CH_2CCH}$), 3.91-3.83 (2H, m, H-5, H-6b), 2.44 (1H, t, $J = 0.5$ Hz, $\underline{CH_2CCH}$), 2.14, 2.11, 2.07 (9H, 3s, $\underline{COCH_3}$); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 170.7, 170.6, 169.8 (3 $\underline{COCH_3}$), 133.1, 132.6, 129.0, 128.1 (6 C_{AR}), 86.7 (C-1), 79.2 ($\underline{OCH_2CCH}$), 76.9 (C-3), 75.4 ($\underline{OCH_2CCH}$), 74.7 (C-5), 68.6 (C-4), 65.9 (C-2), 62.4 (C-6), 56.7 ($\underline{OCH_2CCH}$), 21.2, 20.9, 20.9 (3 $\underline{COCH_3}$); ESI-MS calcd for $C_{21}H_{24}O_8S + (Na^+)$: 459.1; found: 459.3.



2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-propynyl- β -D-galactopyranose **6**: A solution of **5** (0.111g, 0.3 mmol) in MeOH (10 mL) was cooled at -78°C . The solution was degassed by bubbling with nitrogen. O_3 was then passed through the solution with vigorous stirring. After 30 minutes TLC showed disappearance of the starting material. Dry nitrogen was passed through the cold solution in order to remove the excess of O_3 . Me_2S (0.5 mL) was added and stirred 30 minutes at -78°C and 1 hour at room temperature. After evaporation, the resulting crude was dissolved in MeOH (10 mL) and Na_2CO_3 (0.6 mmol) was added at 0°C . Ohira's reagent (0.5 mmol) dissolved in 1 mL of MeOH was added to the mixture and was stirred over night at room temperature. The solution was then concentrated, ether was added and the organic solution was washed with water, dried over sodium sulfate and concentrated under reduce pressure. To the resulting crude material Ac_2O (3 mL), pyridine (3 mL) and DMAP (10 mg) were added. The reaction mixture was stirred 20 hours at room temperature and the resulting solution was concentrated and purified by flash silica gel column chromatography using a mixture of hexanne: ethyl acetate (2:1) to afforded **6** (0.095g, 86%) as a white solid; R_f : 0.5 (hexane: AcOEt, 1:3); $[\alpha]_D^{20} +13.4$ (c 0.1 in CHCl_3); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.51 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-7), 5.20 (1H, t, $J = 9.9$ Hz, H-5), 5.04 (1H, dd, $J = 3.6, 10.2$ Hz, H-6), 4.18-4.06 (2H, m, H-9), 3.91 (1H, t, $J = 6.6$ Hz, H-8), 3.60 (1H, m, H-4), 2.52 (2H, m, H-3), 2.16 (3H, s, CH_3CO), 2.12 (1H, m, H-1), 2.06 (3H, s, CH_3CO), 2.05, (3H, s, CH_3CO), 1.99 (3H, s, CH_3CO); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 170.4, 170.2, 170.1, 169.7 (4 CH_3CO), 79.2 (C-2), 76.4, 74.2, 71.8, 70.1, 69.0, 67.4, 61.4 (C-6), 22.4 (C-3), 20.8, 20.6, 20.5, 20.5 (4 CH_3CO).

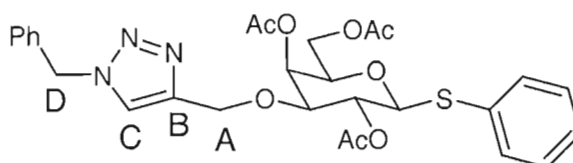


Phenyl 3-*O*-[2-(1-*tert*-butoxyacetyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]-2,4,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl **14-OAc** was isolated as a white solid (92 %); mp 85 °C; $[\alpha]_D^{20} +43.3$ (c 0.12 in DCM); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.62 (1H, s, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 7.49-7.46 (2H, m, H_{AR}), 7.29-7.26 (3H, m, H_{AR}), 5.45 (1H, dd, $J = 3.3$ Hz, H-4), 5.10 (1H, dd, $J = 9.8$ Hz, H-2), 5.02 (2H, s, COCH_2N), 4.69 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-1), 4.62 (2H, m, OCH_2C), 4.16-4.12 (2H, m, H-6a, H-6b), 3.85 (1H, ddd, $J = 6.0$ Hz, H-5), 3.74 (1H, dd, $J = 3.5, 9.6$ Hz, H-3), 2.09, 2.04, 2.02 (9H, 3s, COCH_3), 1.46 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 170.3, 170.2, 169.5 (3 COCH_3), 165.0 ($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 132.8 (C-B), 132.1, 128.7, 127.7 (6 C_{AR}), 124.3 (C-C), 86.4, 83.7 (C-1), 77.7 (C-3), 74.4 (C-5), 68.6 (C-4), 66.3 (C-2), 62.9, 62.0 (C-A, C-6), 51.3 (C-D), 27.9, 27.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 20.7, 20.6 (3 COCH_3); ESI-MS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S} + (\text{Na}^+)$; 616.2; found: 616.3.

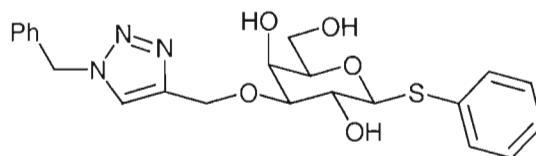


Phenyl 3-*O*-[2-(1-*tert*-butoxyacetyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]-2,4,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl **14** was obtained as a white solid (quant.); mp 102 °C; $[\alpha]_D^{20} + 0.6$ (c 0.11 in MeOH); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 7.93 (1H, s, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 7.43-7.39 (2H, m, H_{AR}), 7.27-7.21 (3H, m, H_{AR}), 5.12 (2H, s, C-D), 4.62 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1), 4.03 (2H, m, C-A), 3.65-3.44 (6H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b);

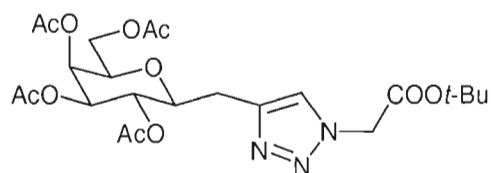
^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ 171.2 (COOH), 132.5 (C-B), 131.3, 129.4, 128.0 (6 C_{AR}) 126.5 (C-C), 87.9 (C-1), 81.5 (C-3), 78.9 (C-5), 68.2 (C-4), 65.4 (C-2), 61.7, 61.0 (C-6, C-A), 51.5 (C-D); ESI-MS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_7\text{S} + (\text{Na}^+)$: 434.1; found: 434.3.



Phenyl 3-*O*-[2-(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]-2,4,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl **15-OAc** was isolated as a yellow oli (97 %); mp 79.5 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 42.4$ (c 0.34 in DCM); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.50 1H, s, $\text{H}_{\text{triazole}}$, 7.49-7.40 (1H, m, H_{AR}), 7.39-7.34 (3H, m, H_{AR}), 7.31-7.28 (6H, m, H_{AR}), 5.51 (2H, m, PhCH_2N), 5.43 (1H, dd, $J = 2.7$ Hz, H-4), 5.07 (1H, dd, $J = 9.9$ Hz, H-2), 4.65 (2H, m, OCH_2C), 4.62 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-1), 4.18-4.11 (2H, m, H-6a, H-6b), 3.85 (1H, ddd, $J = 6.8$ Hz, H-5), 3.73 (1H, dd, $J = 3.2, 9.6$ Hz, H-3), 2.17, 2.07, 2.06 (9H, 3s, COCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 170.0, 169.9, 169.1 (3 COCH_3), 144.6 (C-B), 134.2, 132.6, 131.7, 128.7, 128.4, 128.4, 127.8, 127.5 (12 C_{AR}), 122.5 (C-C), 86.0 (C-1), 77.3 (C-3), 74.1 (C-5), 68.3 (C-4), 66.0 (C-2), 62.5, 61.7 (C-A, C-6), 53.7 (C-D), 20.3, 20.3 (3 COCH_3); ESI-MS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8\text{S} + (\text{Na}^+)$: 592.2; found: 592.3.

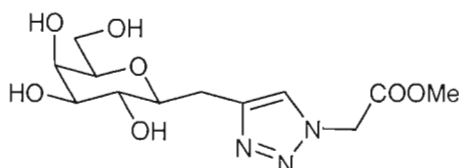


Phenyl 3-*O*-[2-(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]-1-thio-β-*D*-galactopyranosyl **15** was obtained as a white solid (quant.); 109-110 °C; $[\alpha]_D^{20} + 6.4$ (c 0.13 in MeOH); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.93 (1H, s, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 7.43-7.41 (2H, m, H_{AR}), 7.27-7.22 (8H, m, H_{AR}), 5.49 (2H, s, PhCH_2N), 4.60 (3H, m, H-1, OCH_2C), 3.96 (1H, dd, $J = 3.0$ Hz, H-4), 3.60-3.54 (4H, m, H-2, H-5, H-6a, H-6b), 3.46 (1H, dd, $J = 3.5, 9.6$ Hz, H-3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 131.3 (C-B), 129.4, 129.2, 128.8, 128.1, 128.0 (12 C_{AR}), 125.3 (C-C), 88.0 (C-1), 81.5 (C-3), 78.8 (C-5), 68.1 (C-4), 65.4 (C-2), 61.7, 61.0 (C-6, C-A), 54.0 (C-D); ESI-MS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5\text{S} + (\text{Na}^+)$: 466.1; found: 466.3.

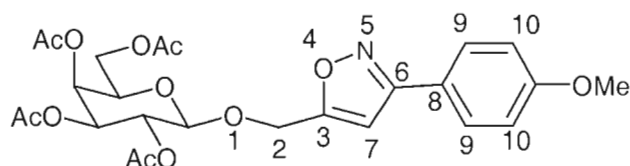


2-{4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl)-[1,2,3]triazole-2-yl-methyl} *tert*-Butoxycarbonyl **16-OAc** (94%); R_f : 0.5 (AcOEt); $[\alpha]_D^{20} + 13.2$ (c 0.1 in CHCl_3); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.54 (1H, s, H-1), 5.40 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-7), 5.15 (1H, t, $J = 9.9$ Hz, H-5), 4.99 (3H, m, H-1', H-6), 4.11-4.03 (2H, m, H-9), 3.82 (1H, t, $J = 6.6$ Hz, H-8), 3.68 (1H, td, $J = 9.3, 2.8$ Hz, H-4), 3.05 (1H, dd, $J = 14.4, 2.7$ Hz), 2.87 (1H, dd, $J = 15.4, 9.3$ Hz), 2.12 (3H, s, CH_3CO), 2.02 (3H, s, CH_3CO), 1.98 (3H, s, CH_3CO), 1.94 (3H, s, CH_3CO), 1.44 (9H, s, *t*-Bu); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 170.2, 170.1, 170.0, 169.8 (4 CH_3CO), 165.1, 143.6 (C-1'), 123.9 (C-2'), 83.5, 77.1,

74.0, 71.8, 69.0, 67.9 (C-6), 61.5, 51.3, 28.5, 27.8 (t-Bu), 20.6, 20.5, 20.5, 20.4 (4 CH_3CO).

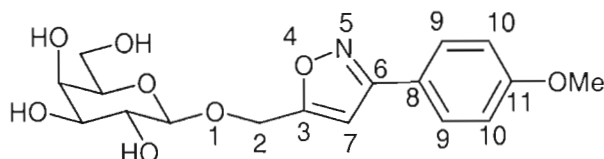


2-[4-(β -D-galactopyranosyl)-[1,2,3]triazole-2-yl-methyl} *tert*-Butoxycarbonyl **16**
(quant.); ESI-MS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_{12} + (\text{Na}^+)$: 340.1; found: 340.3.

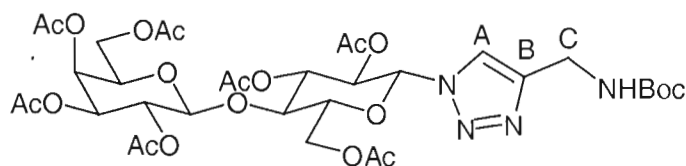


1-*O*-[2-(3-methoxyphenyl)-isoxazol-5-yl]-methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranoside **18-OAc** was obtained as a white solid (61%); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.72 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-9'), 6.96 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-10'), 6.51 (1H, s, H-7'), 5.39 (1H, dd, $J = 2.7$ Hz, H-4), 5.26 (1H, dd, $J = 7.9, 10.44$ Hz, H-2), 5.02 (1H, dd, $J = 3.5, 10.4$ Hz, H-3), 4.85 (2H, dd, $J = 13.7, 41.4$ Hz, H-2'), 4.63 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1), 4.20-4.09 (2H, m, H-6a, H-6b), 3.95 (1H, ddd, $J = 6.5$ Hz, H-5), 3.84 (3H, s, OMe), 2.15 (3H, s, CH_3CO), 2.03 (3H, s, CH_3CO), 1.97 (3H, s, CH_3CO), 1.86 (3H, s, CH_3CO); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 170.3, 170.1, 169.9, 169.4 (4 CH_3CO), 168.0 (C-6'), 161.9 (C-11'), 161.0 (C-3'), 128.1 (C-9'), 121.0 (C-8'), 114.2 (C-10'), 101.2 (C-7), 100.3 (C-1), 70.8 (C-5), 70.6 (C-3), 68.4 (C-4), 66.8 (C-2), 61.5

(C-6), 61.1 (C-2'), 55.2 (OMe), 20.6, 20.5, 20.5, 20.4 (4 CH_3CO); ESI-MS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_{12} + (\text{Na}^+)$: 558.2; found: 558.3.

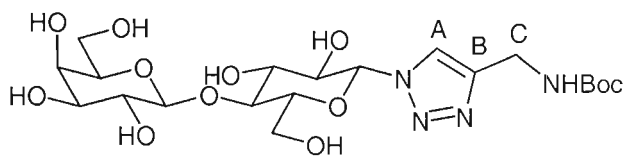


1-*O*-[2-(3-methoxyphenyl)-isoxazol-5-yl]-methyl]- β -D-galactopyranoside **18** was obtained as white solid (quant.); mp 134-135 °C; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} -14.9$ (c 0.5 in H_2O); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.67 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-9'), 6.93 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-10'), 6.77 (1H, s, H-7'), 4.29 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1), 3.76 (3H, s, OMe), 3.75-3.61 (2H, m, H-2, H-4), 3.53-3.37 (5H, m, H-2', H-3, H-5, H-6a, H-6b); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 171.11 (C-6'), 163.52 (C-11'), 162.79 (C-3'), 129.26 (C-9'), 122.49 (C-8'), 115.45 (C-10'), 104.34 (C-7'), 102.48 (C-1), 76.96 (C-5), 74.88 (C-3), 72.41, 70.32, (C-2, C-4), 62.58, 62.36 (C-6, C-2'), 55.84 (OMe); ESI-MS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_8 + (\text{Na}^+)$: 390.1; found: 390.3.

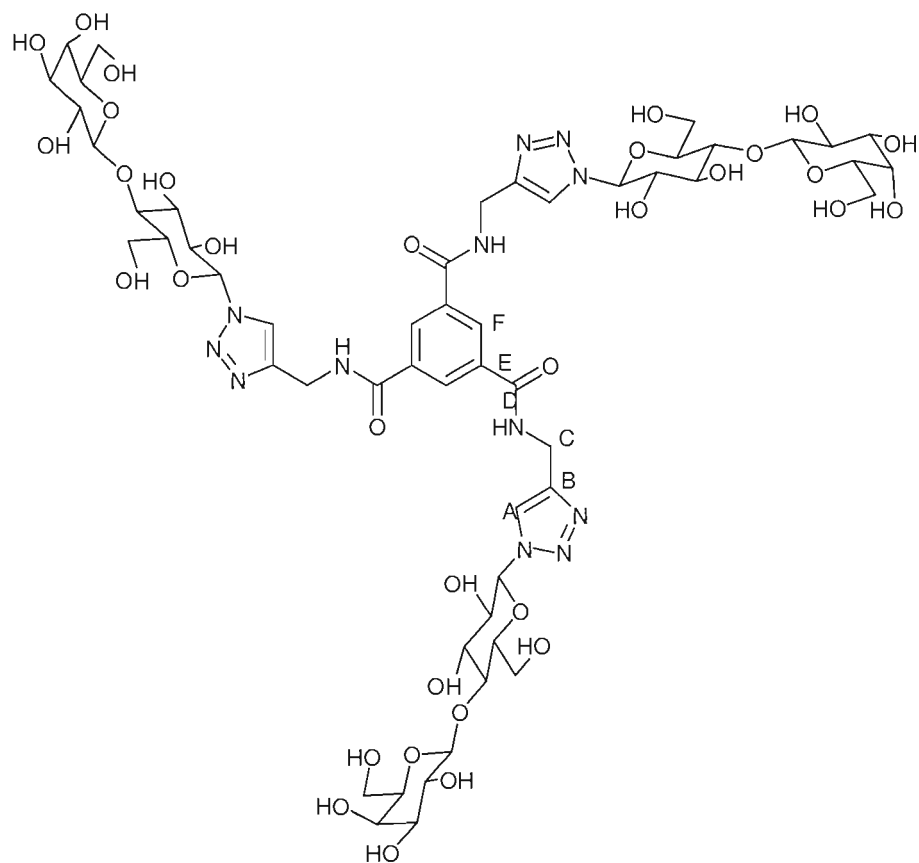


(tert-Butoxycarbonyl)amino-2-{1-(2,2',3,3',4',6,6'-hepta-*O*-acetyl- β -D-lactosyl)[1,2,3]triazole-4-yl} **19-OAc** was isolated as a white solid (98%); mp 176-177 °C; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} -12.3$ (c 1 in CHCl_3); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.65 (1H, s, H-A), 5.76 (1H, m, NH), 5.36-5.24 (3H, m, H-2, H-3, H-4'), 5.09 (1H, dd, $J = 7.9, 10.44$ Hz, H-

2'), 4.93 (1H, dd, $J = 3.5, 10.44$ Hz, H-3'), 4.49-4.42 (3H, m, H-1, H-1', H-6a), 4.41-4.36 (2H, m, H-C), 4.15-4.03 (3H, m, H-6a', H-6b, H-6b'), 3.92-3.84 (3H, m, H-4, H-5, H-5'), 2.13, 2.07, 2.05, 2.03, 2.02, 1.94, 1.84 (21H, 7s, CH_3CO), 1.41 (9H, s, *t*-Bu); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 170.3, 170.1, 170.0, 170.0, 169.4, 169.0 (7 CH_3CO), 155.7 ($\text{NCOOC}(\text{CH}_3)_3$), 146.0 (C-B), 120.4 (C-A), 101.0 (C-1'), 85.4 (C-1), 79.7 ($\text{NCOOC}(\text{CH}_3)_3$), 75.8 (C-4), 75.5 (C-3), 72.5 (C-5), 70.8 (C-3'), 70.7 (C-5'), 70.4 (C-2), 68.9 (C-2'), 66.5 (C-4'), 61.6 (C-6), 60.7 (C-6'), 36.0 (C-C), 28.3 ($\text{NCOOC}(\text{CH}_3)_3$), 20.7, 20.6, 20.6, 20.5, 20.5, 20.4, 20.1 (7 CH_3CO); ESI-MS calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{19} + (\text{H}^+)$: 817.3; found: 817.4.



(tert-Butoxycarbonyl)amino-2-{1-(β-D-lactosyl) [1,2,3]triazole-4-yl} **19** was obtained as a white solid (quant.); mp 168.5-169.5 °C; ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 7.98 (1H, s, H-A), 5.57 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H-1), 4.37 (1H, s, H-1'), 4.27 (2H, s, H-C), 3.92-3.34 (12H, m, H-2, H-2', H-3, H-3', H-4, H-4', H-5, H-5', H-6, H-6'), 1.39 (9H, s, *t*-Bu). ESI-MS calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_{20} + (\text{Na}^+)$: 545.2; found: 545.4.



20 was isolated as a white solid (0.95%); mp 200 °C; ^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 8.22 (3H, s, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 8.04 (3H, s, H_{AR}), 5.52 (3H, d, $J = 9.1$ Hz, NH), 4.531 (6H, s, CH_2), 4.28 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 3.83-3.39 (36H, m); ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ 168.1 (CONH), 144.9 (C-B), 134.3 (C-F), 129.2 (C-A), 123.3 (C-E), 103.0 (C-1'), 87.4 (C-1), 77.8 (C-4), 77.5 (C-3), 75.5 (C-5), 74.6 (C-2), 72.6 (C-3'), 72.1 (C-5'), 71.0 (C-2'), 68.7 (C-4'), 61.2 (C-6'), 59.9 (C-6), 35.2 (C-C).

¹H NMR spectrum (300 MHz, CDCl₃) of compound 18-OAc.

STANDARD 1H OBSERVE

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl₃

Ambient temperature

GEMINI-300BB "gemin12000"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.7 degrees

Acq. time 1.998 sec

Width 4500.5 Hz

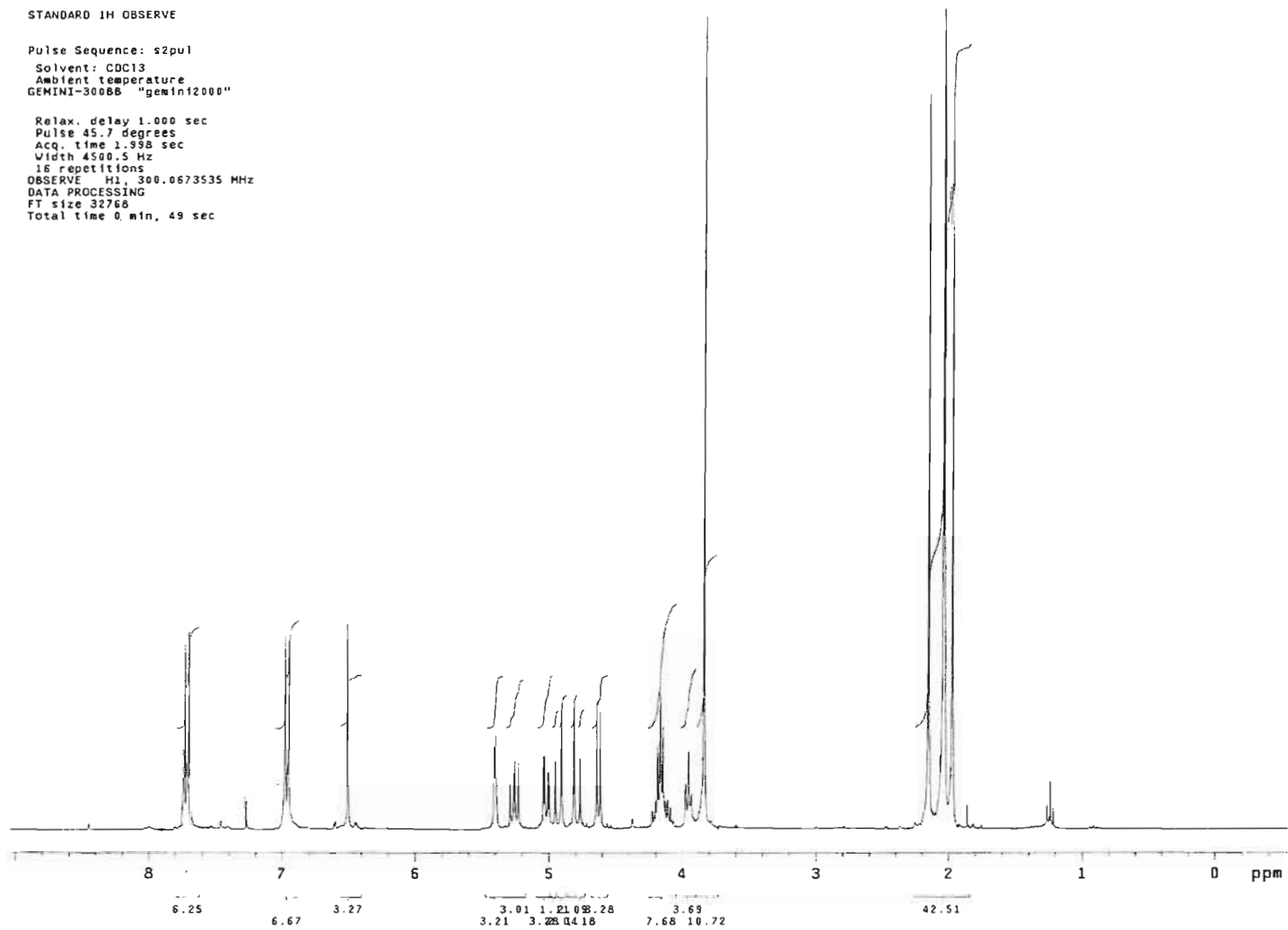
16 repetitions

OBSERVE H1, 300.0673535 MHz

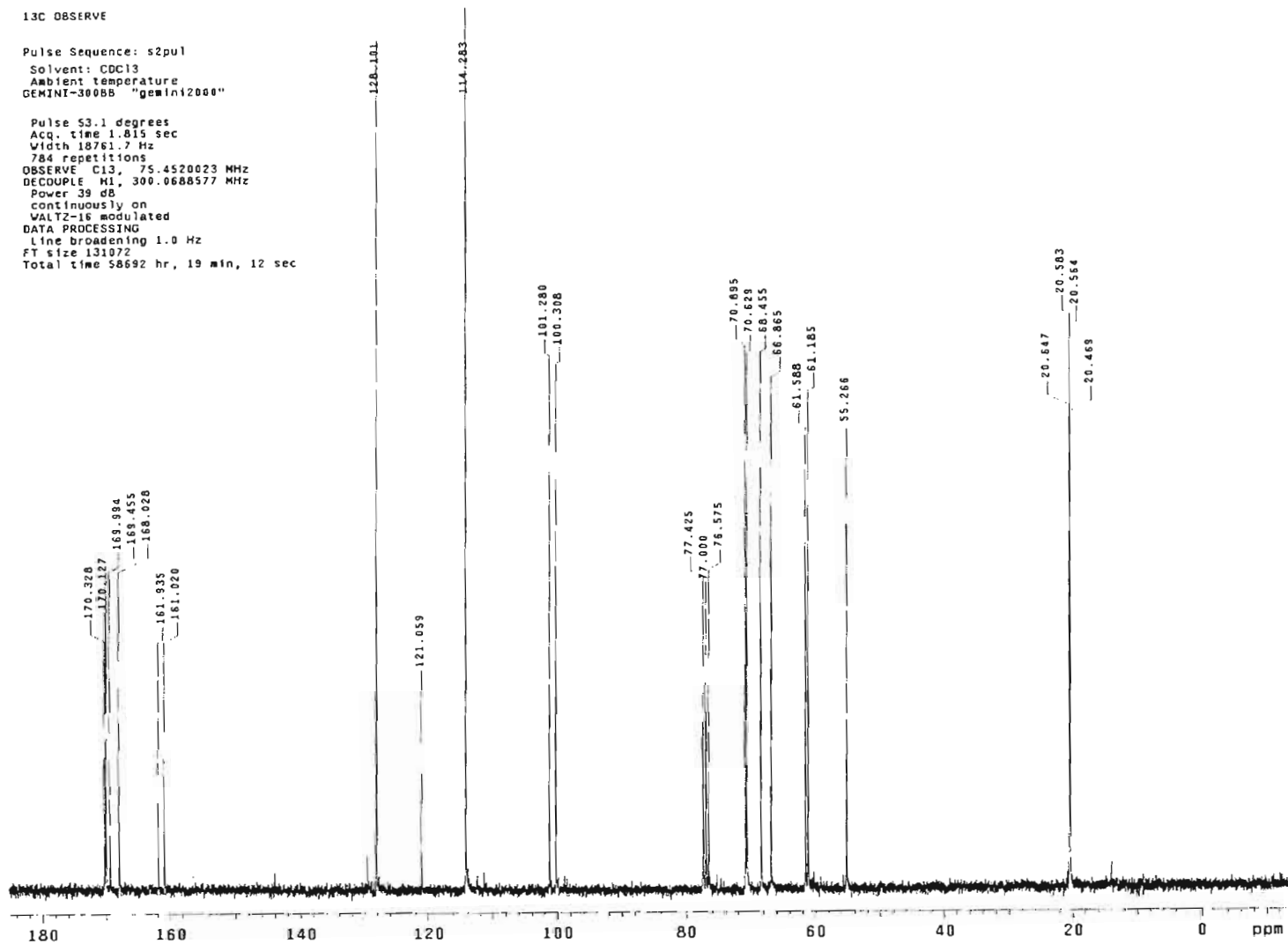
DATA PROCESSING

FT size 32768

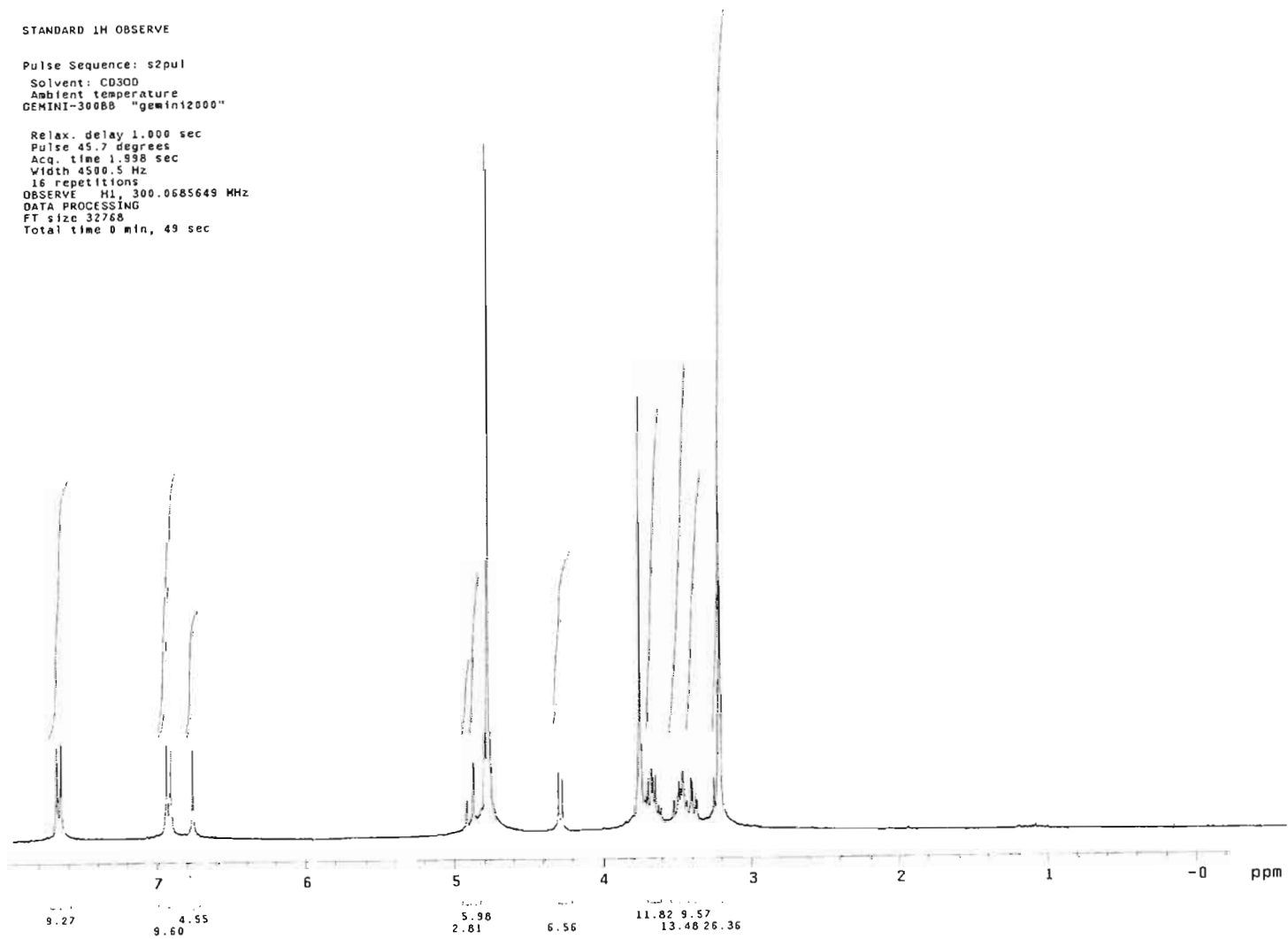
Total time 0 min, 49 sec



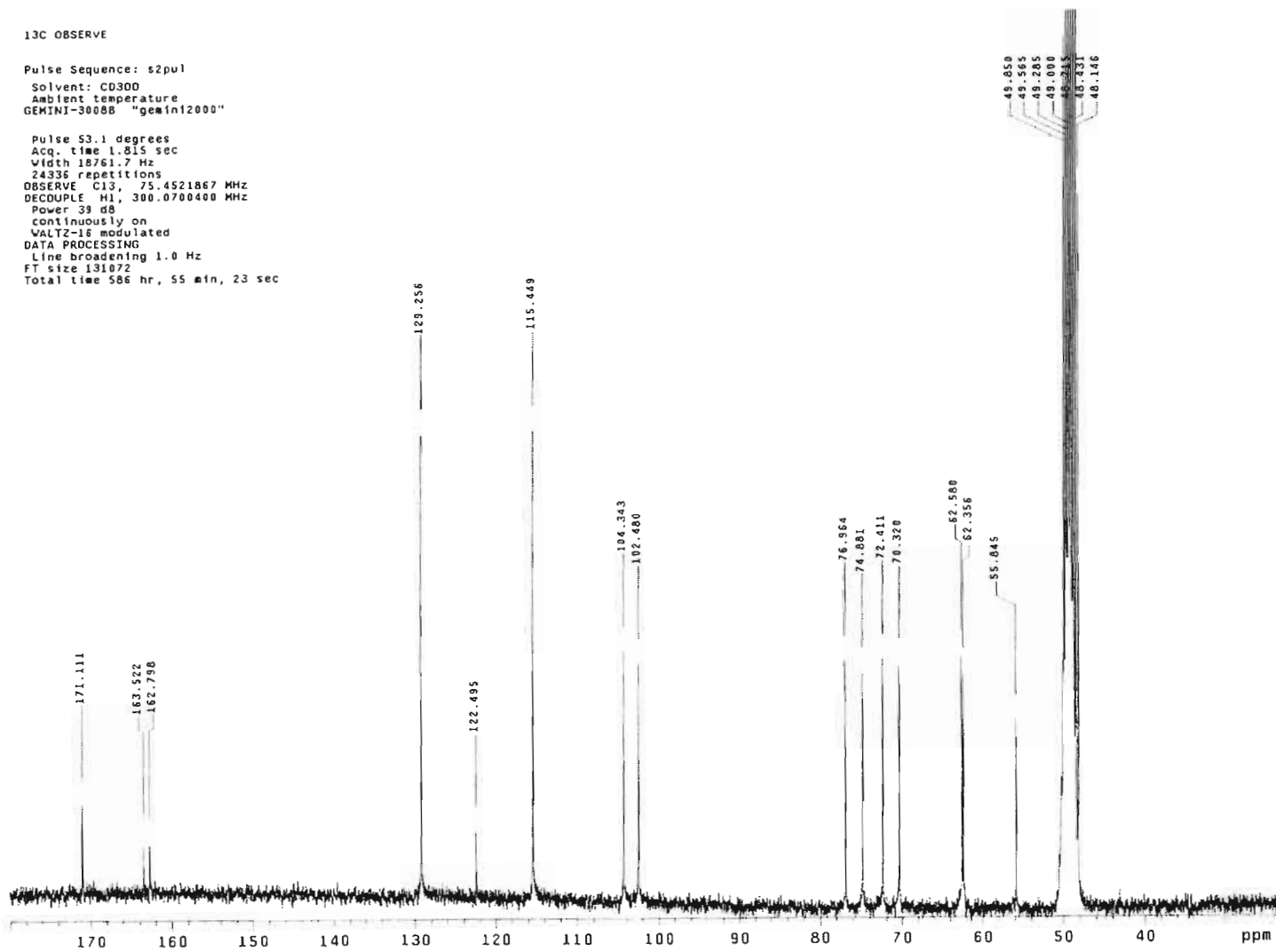
¹³C NMR spectrum (75 MHz, CDCl₃) of compound 18-OAc.



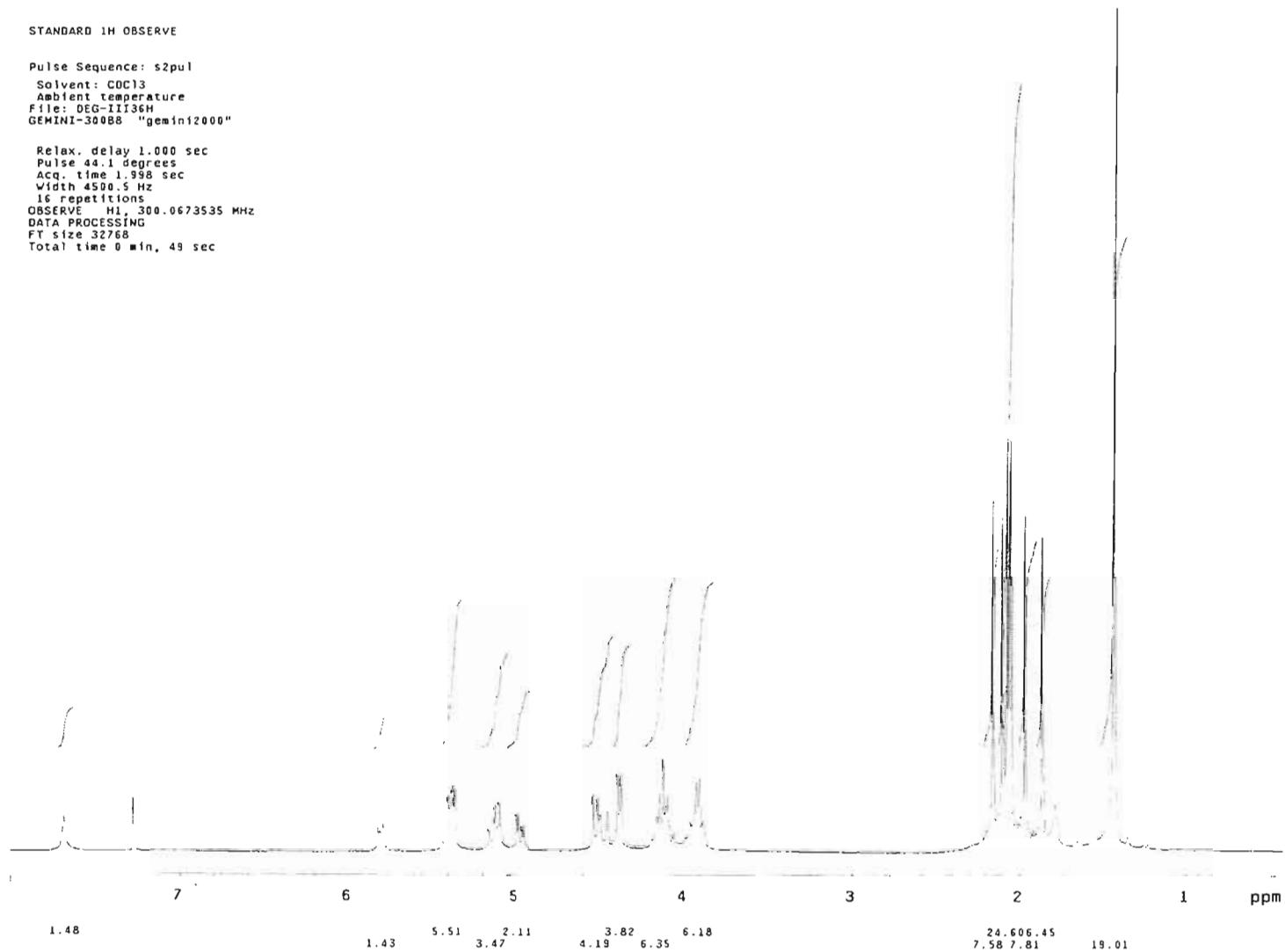
^1H NMR spectrum (300 MHz, CD_3OD) of compound 18.



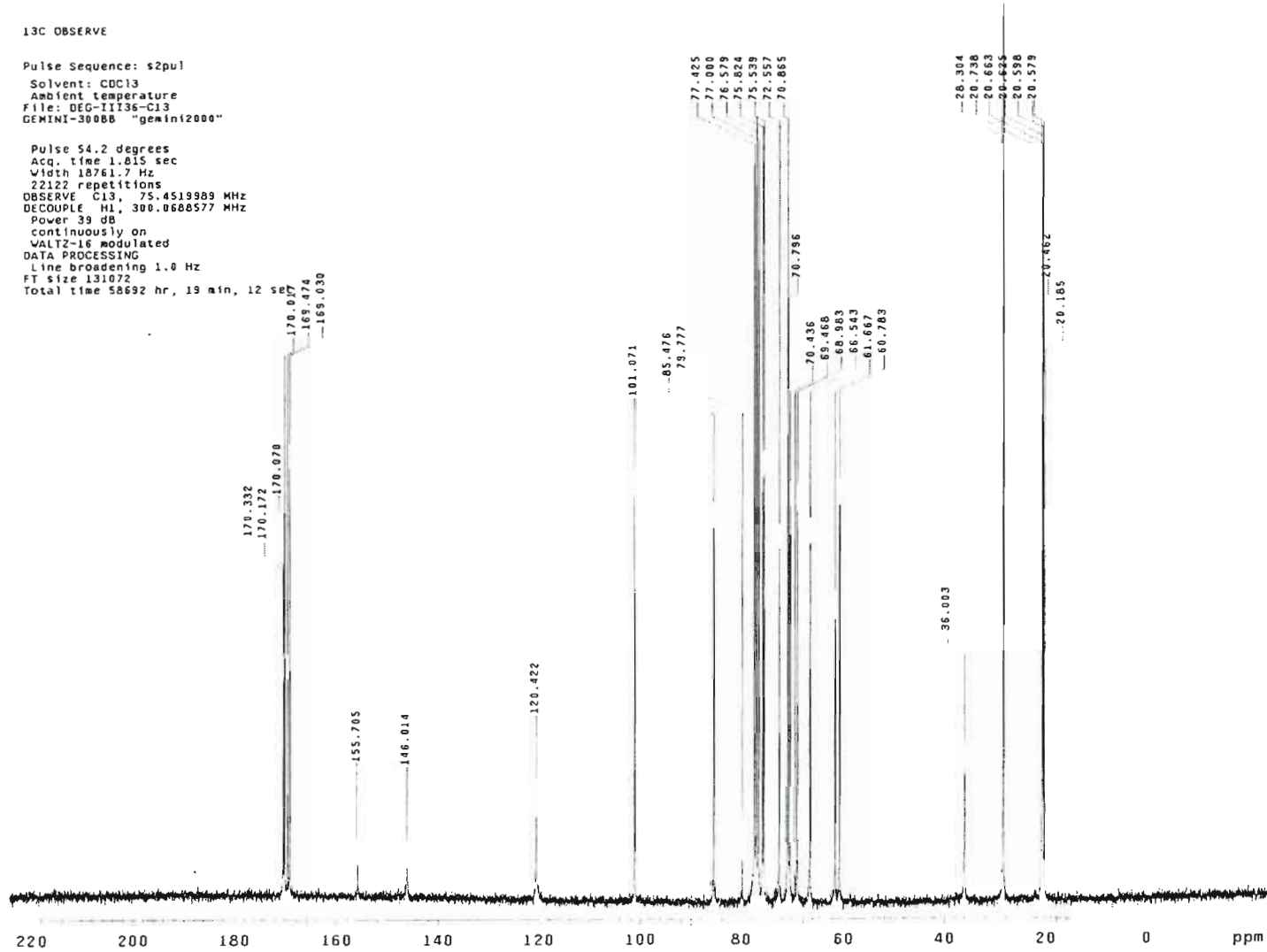
¹³C NMR spectrum (75 MHz, CD₃OD) of compound 18.



¹H NMR spectrum (300 MHz, CDCl₃) of compound 19-OAc.



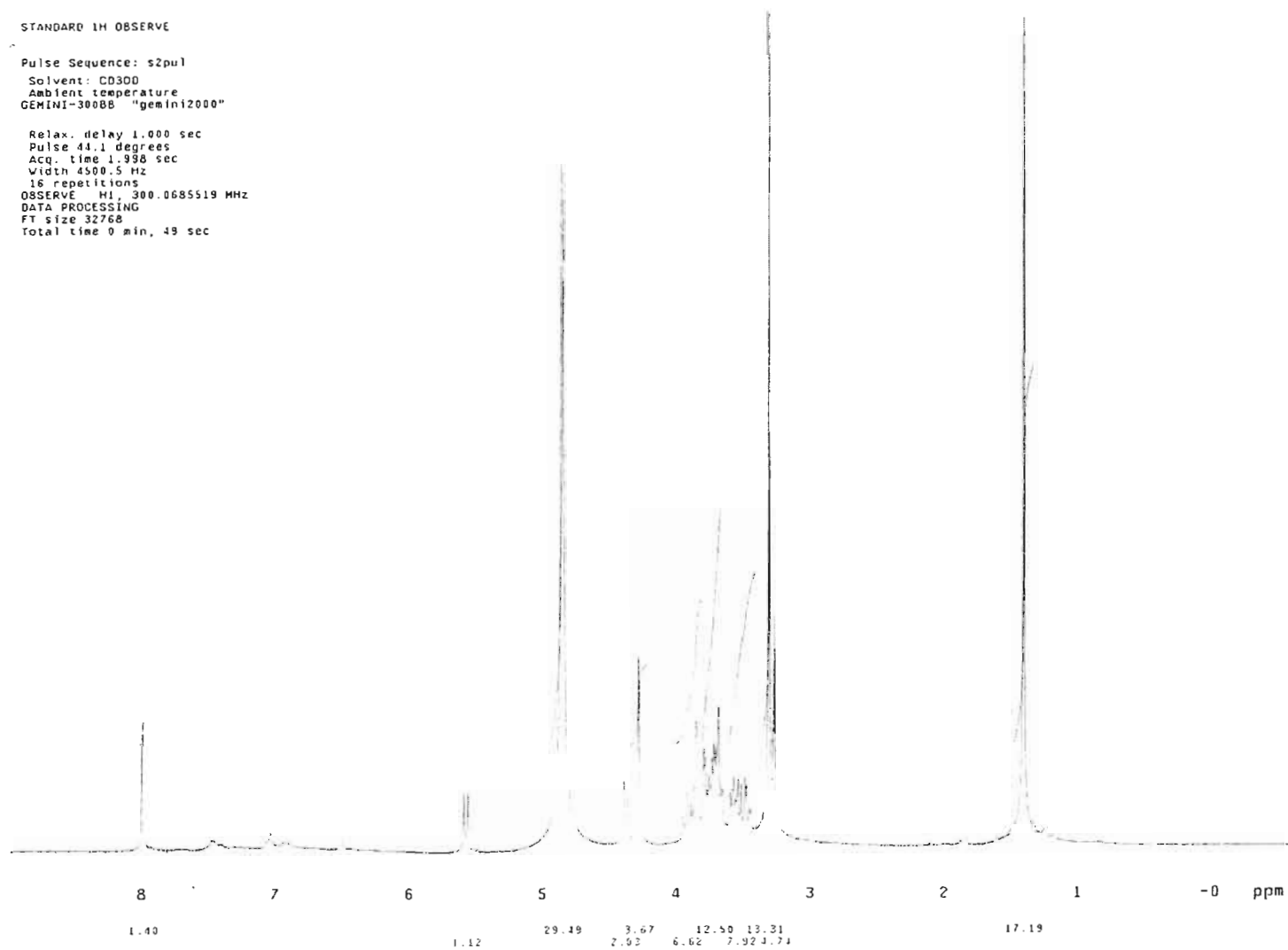
¹³C NMR spectrum (75 MHz, CDCl₃) of compound 19-OAc.



¹H NMR spectrum (300 MHz, CD₃OD) of compound 19.

STANDARD 1H OBSERVE
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CD300
Ambient temperature
GEMINI-300BB "geminiz000"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 44.1 degrees
Acq. time 1.998 sec
Width 4500.5 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 300.0685519 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min, 49 sec



¹H NMR spectrum (300 MHz, CDCl₃) of compound 20-OAc.

STANDARD 1H OBSERVE

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl₃

Ambient temperature

GEMINI-30088 "gemini2000"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 44.1 degrees

Acq. time 1.958 sec

Width 4500.5 Hz

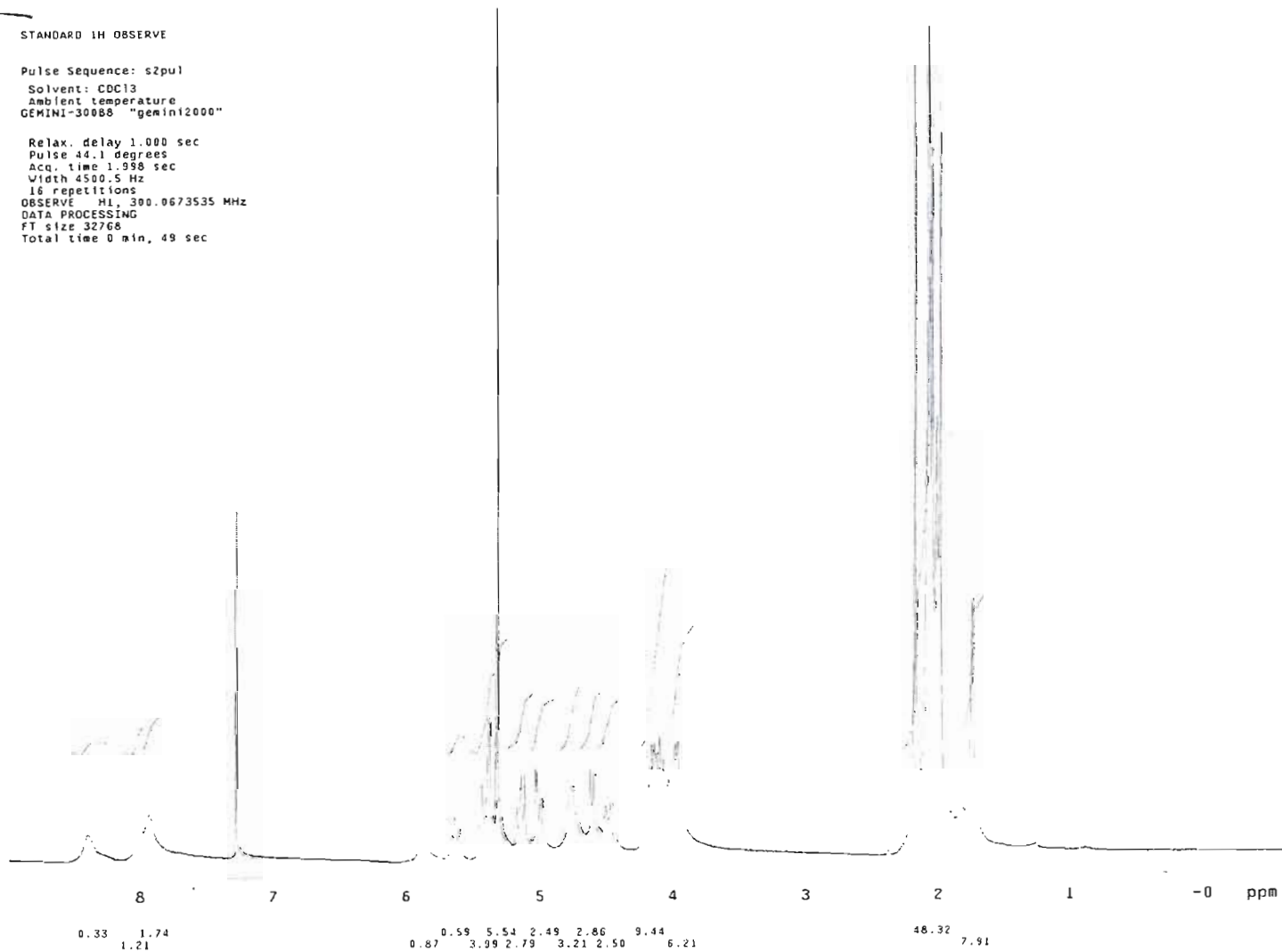
16 repetitions

OBSERVE H1, 300.0673535 MHz

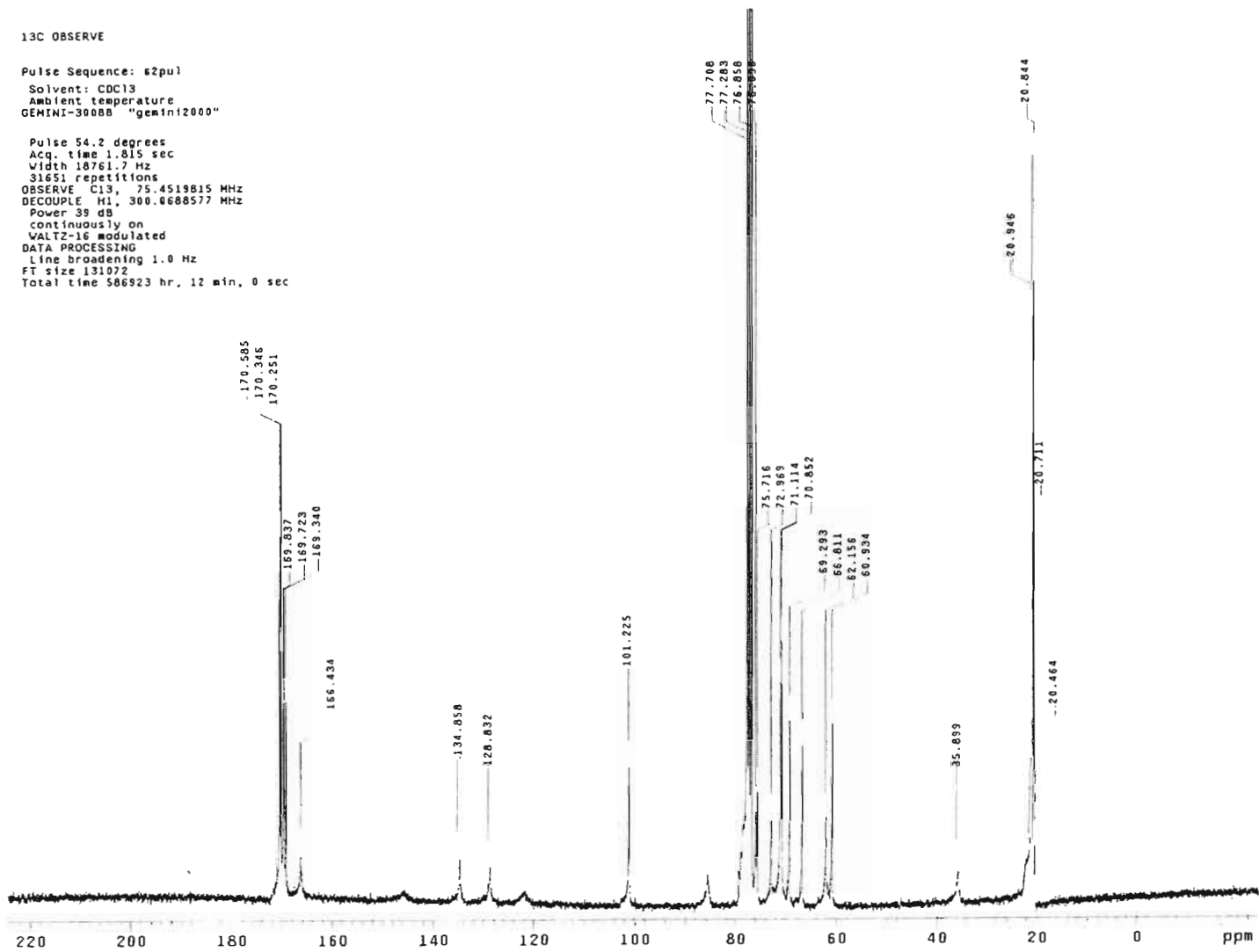
DATA PROCESSING

FT size 32768

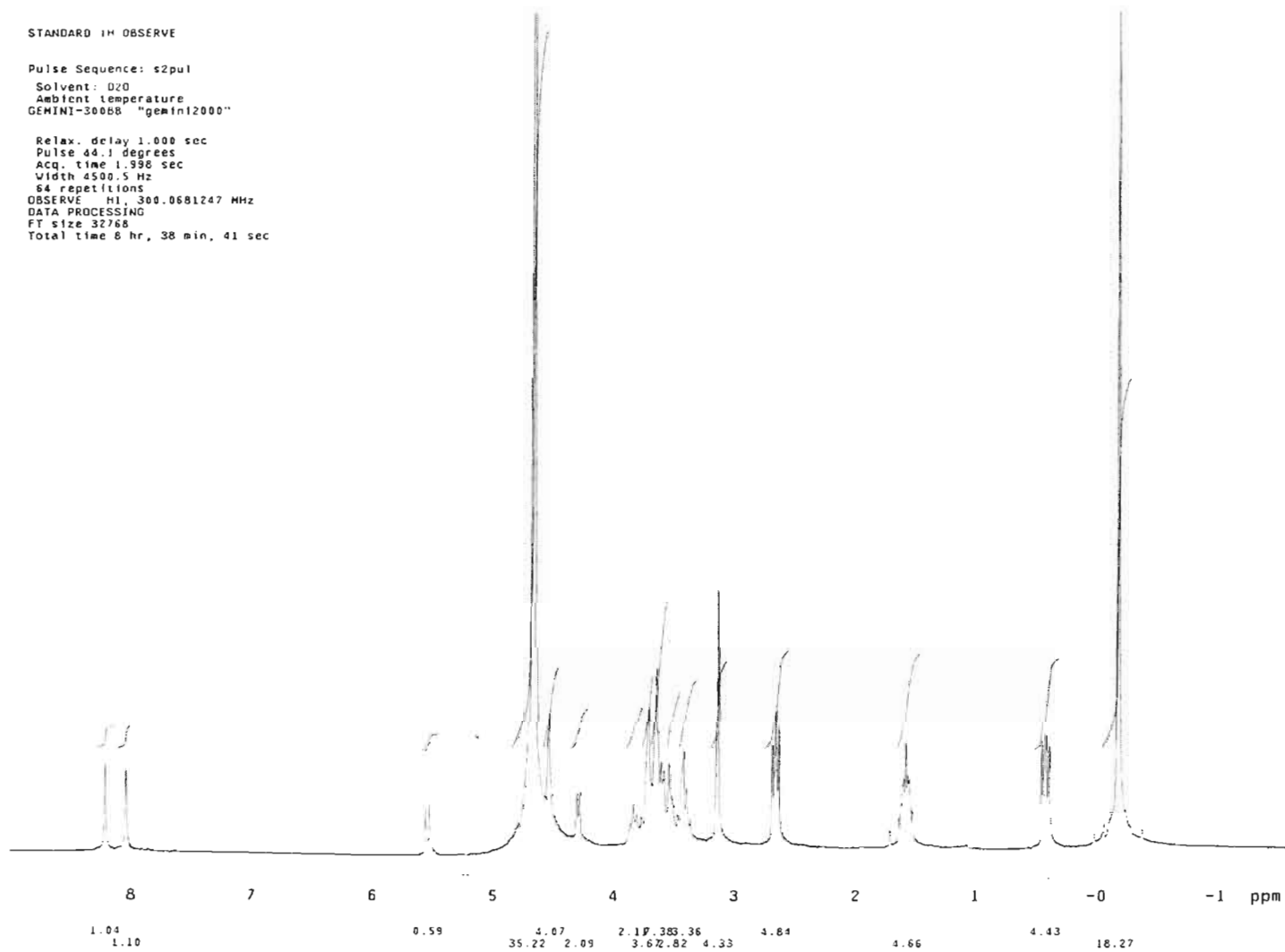
Total time 0 min, 49 sec



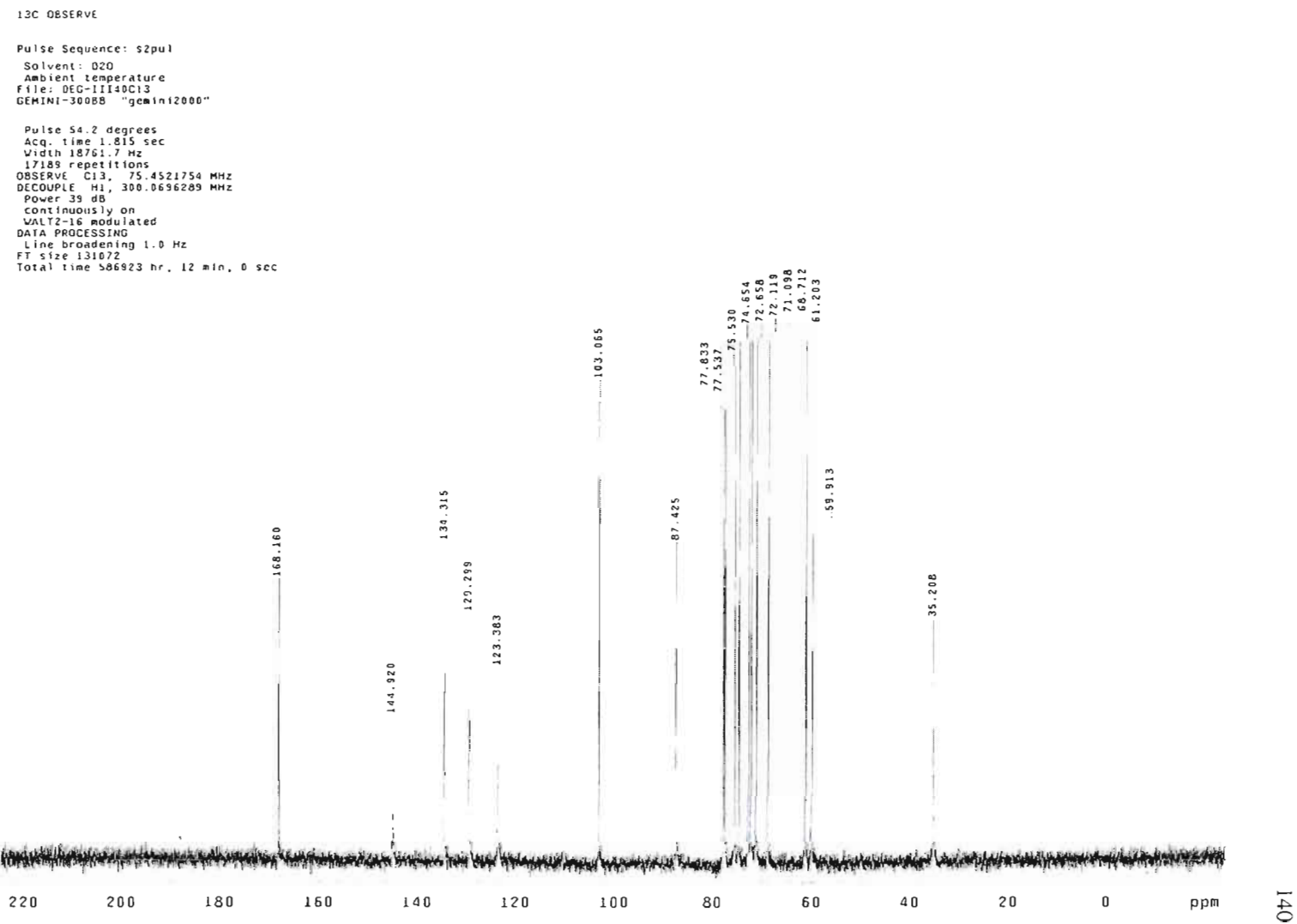
¹³C NMR spectrum (75 MHz, CD₃OD) of compound 20-OAc.



¹H NMR spectrum (300 MHz, CD₃OD/D₂O) of compound **20**.



^{13}C NMR spectrum (75 MHz, CD_3OD) of compound 20.



2.3 Effects of Linker Rigidity and Orientation of Mannoside Clusters for Multivalent Interactions with Proteins

René Roy^{1,2,*}, M. Coranzon Trono², and Denis Giguère¹

¹Current address: Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada

²Department of Chemistry, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, K1N 6N5, Canada

Publié pour le périodique *ACS Symposium Series* :

Roy, R.; Trono, M. C.; Giguère, D. *Glycomimetics*, **2005**, 896, 137-150.

2.3.1 Résumé

Les interactions multivalentes entre un saccharide et une protéine sont connues dans les processus biologiques. La nature utilise cette stratégie pour compenser la faible affinité et sélectivité des ligands saccharidiques. Les protéines possédant un domaine de reconnaissance pour le mannose sont courantes chez les mammifères et les microorganismes. Dans des efforts continus de comprendre les interactions multivalentes ligand-lectine, des dendrimères de mannosides ont été synthétisés possédant une aglycone rigide ou aromatique.

Une série de clusters di-, tri- et hexamérique d' α -D-mannopyranosides possédant des espaceurs rigides ont été construits dans le but d'évaluer les effets des distances inter-saccharides pour des interactions multivalentes avec la phytohémagglutinine de *Canavalia ensiformis* (Concanavalin A). Pour ce faire, des *O*-aryles et des *O*-propargyles glycosides ont été synthétisés et couplés, utilisant des métaux de transitions pour la catalyse des réactions de couplages et de métathèses croisées. Des *ortho*-, *méta*- et *para*-iodophényles mannosides, dans les conditions de Sonogashira (palladium(0)), ont réagi pour donner un mélange de dimères symétriques et non symétriques. L'octacarbonyle de dicobalt produisant la réaction de benzannélation à partir de mannosides acétyléniques a donné des hexamères montrant une très forte habileté à former des réticulations avec Con A.

L'affinité relative de tous les clusters de mannosides pour former une interaction multivalente avec une protéine a été évaluée en utilisant un essai néphélométrique (turbidimétrie). La phytohémagglutinine tétramérique de *Canavalia ensiformis* a été utilisée comme modèle puisque sa capacité à former des réticulations est bien connue en présence de clusters de mannosides. Les dimères possédant les distances inter-mannosides les plus grandes ont donné les meilleurs résultats dans la famille dimérique. Par opposition, les dimères possédant les plus courtes distances inter-mannosides ont pris plus de temps à créer le phénomène de réticulation.

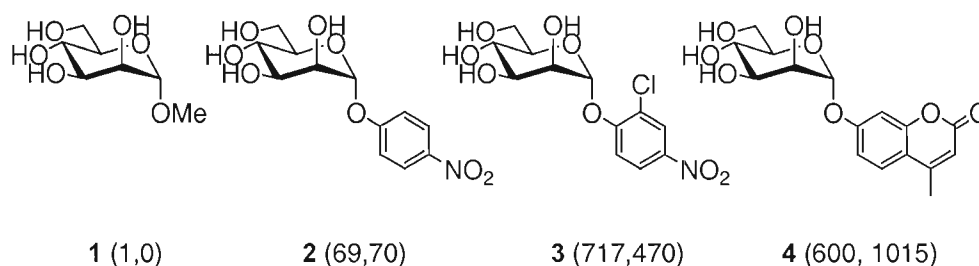
2.3.2 Manuscript

A series of di-, tri-, and hexameric α -D-mannopyranoside clusters having rigid linkers were constructed in order to evaluate the effects of inter-saccharide distances upon multivalent binding interactions with the phytohemagglutinin from *Canavalia ensiformis* (Concanavalin A). To this end, O-aryl and O-propargyl glycosides were synthesized and then coupled together using transition metal catalyzed cross-coupling reactions. Thus, ortho-, meta-, and para-iodophenyl mannosides were treated with acetylene or propargyl mannoside under palladium(0)-catalyzed Sonogashira conditions to afford mixtures of cross-coupled symmetrical and unsymmetrical dimers. Dicobalt octacarbonyl benz-annulation of acetylenic mannosides provided hexamers showing potent cross-linking ability.

Multivalent carbohydrate protein interactions are ubiquitous in biological systems (1). It is believed that nature uses this strategy to compensate for the generally low affinity and poor selectivity of carbohydrate ligands. There has been several reports demonstrating that glycopolymers (2-5), glycodendrimers (6-8), and even small glycoclusters (9), could achieve enhanced avidity through various reaction mechanisms involving for example “wrapping around” virus particles (5), chelate effects (10), and cross-linking effects (11). The last situation has been particularly well documented for soluble proteins possessing multiple carbohydrate recognition domains (CRDs). Interestingly, several proteins have homologous or very analogous amino acid sequences in their CRDs. This is the case for examples for the family of galectins, mannose binding proteins, and sialoadhesins that bind to their respective carbohydrate ligands with more or less similar affinity constants.

Moreover, Sharon (12) has already demonstrated that bacterial lectins at the tip of fimbriae possess subtle but different affinities for aromatic α -D-

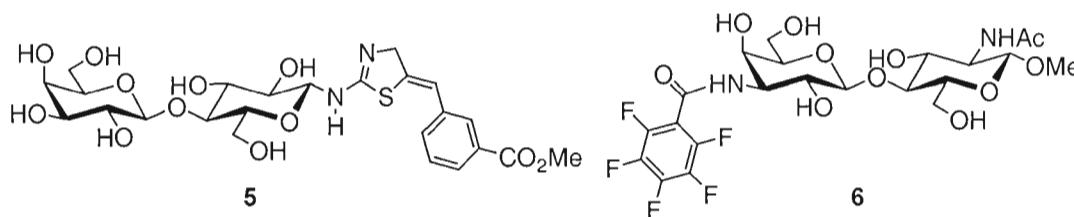
mannopyranosides, thus illustrating the effect of what we coined “sub-site-assisted aglycone binding” (13). For instance, α -D-mannopyranosides **2-4** (Scheme 1) showed 69 to 1015-fold increased inhibitory properties in comparison to methyl mannoside **1** (12). Additionally, discrete differences can be observed between the inhibitory properties of a given mannoside derivative against different strains of bacteria, thus illustrating again that selectivity can be achieved.



Scheme 1 Different mannoside derivatives and their relative inhibitory properties against the interaction of fimbriated *E. coli* O25 or O128 in agglutination of yeasts or adherence to epithelial cells, respectively.

The above situation has also been exemplified with recent findings in the galectin field, wherein lactose and N-acetyllactosamine derivatives **5** and **6** were showed to be 14x and 50x times more potent than their parent saccharides against galectin-3, respectively (Scheme 2). In the first case (14), compound **5** has its aglycone modified by an aromatic residue, while compound **6** (15), screened from a large library of 3'-derivatives, possesses an aromatic amide functionality that was postulated to occupy an hydrophobic pocket in the active site of galectin-3. The efficacy of lactoside **5** was further increased by the development of wedge-type glycodendrimers (14). Indeed, a tetravalent structure derived from **5** was found to be 1071x more potent than the monovalent lactoside in a solid-phase competitive

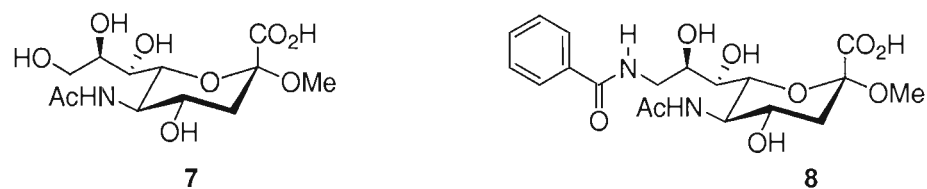
inhibition assay using asialofetuin (ASF) as coating antigen and biotin-labeled galectin-3 for detection.



Scheme 2 Ligands used for the selective inhibition of galectin-3.

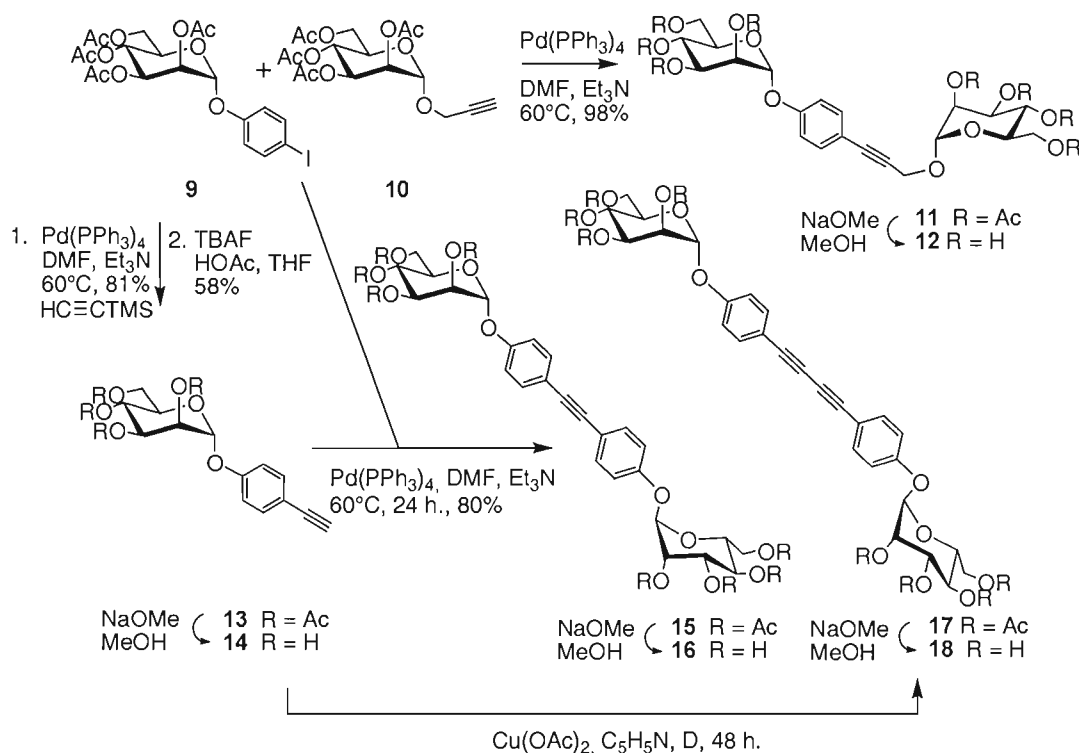
Using galactoside clusters having similar aromatic aglycones to those described herein for the mannosides, we found that a trimeric structure had the highest affinity for galectin-3 while a tetramer was more selective for galectins-1 and 5 (16). These results point toward a combine approach for the design of more potent and selective carbohydrate mimetics.

Another example of selective inhibitions was observed within the sialic acid binding immunoglobulin (Ig)-like lectins (Siglecs) that comprise a family of 11 type 1 membrane receptors involved in cell-cell recognition events. The synthesis of various sialoside analogs differing by their substituents at position 9 of the glycerol side chain illustrated again that compounds with significantly enhanced affinities and specificities could be achieved (17). Scheme 3 below shows the structural differences between compounds **7** and **8** in which the terminal C-9 alcohol functionality was exchanged for a benzamide residue. Compound **8** was 790x more potent than **7** in its binding affinity for the myelin-associated glycoprotein (MAG), known to play an important role in maintaining myelin-axon integrity. The additional benzamide residue was taught to be in closer contact with a tyrosine residue in the vicinity of the active site.



Scheme 3 Structures of sialoside derivatives showing selective inhibitory potencies against a family of type 1 Siglec membrane receptors. Compound **8** was 790 fold more potent than **7** against MAG (Siglec-4).

Proteins having mannoside recognition domains are also ubiquitous and are found within a wide range of mammalian cells and microorganisms (18). Several of these mannose binding proteins have to discriminate self from non-self mannose-containing glycoconjugate epitopes for proper handling of the biochemical information. For instance, macrophages, dendritic cells, and hepatocytes are involved in immune regulations and glycoprotein uptake. They can also recognize the high mannose glycoprotein of HIV (19) and other microorganisms (12). Paradoxally, pathogens such as *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* through their fimbriated lectins, can also bind to multiantennary mannosides on mammalian cell surfaces (12). Thus, it is highly desirable to gain insight into the nature, number, and topology of mannoside clusters required for a specific recognition event.

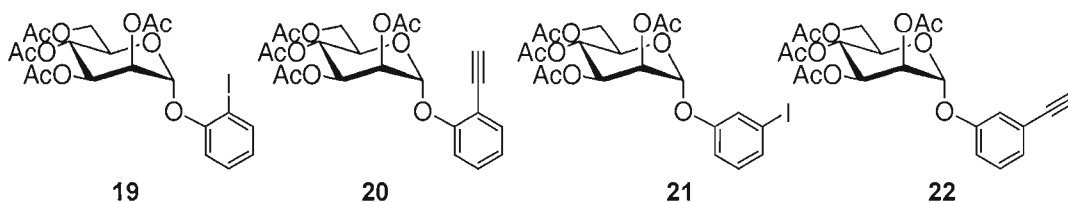


Scheme 3 Palladium(0)-catalyzed syntheses of mannoside dimers using Sonogashira cross-coupling reactions.

In our continued efforts (20-22) to prepare mannoside ligands of improved binding properties against mannose binding proteins (MBP) and the like, we describe herein the syntheses of mannoside dimers, trimers, and hexamers having rigid aromatic aglycones that were built using palladium(0)-catalyzed cross-coupling Sonogashira reactions (23). To this end, key *ortho*-, *meta*-, and *para*-iodophenyl α -D-mannopyranosides were prepared from the corresponding arenols using mannose pentaacetate and boron trifluoride etherate in methylene chloride to afford mannosides **9** (24), **19**, and **21** in 81%, 36%, and 63% yield respectively (Scheme 3 and 4). The known (24, 25) propargyl mannoside **10** was also prepared (78% yield)

by a Lewis acid-catalyzed reaction between mannose pentaacetate (**32**) and propargyl alcohol.

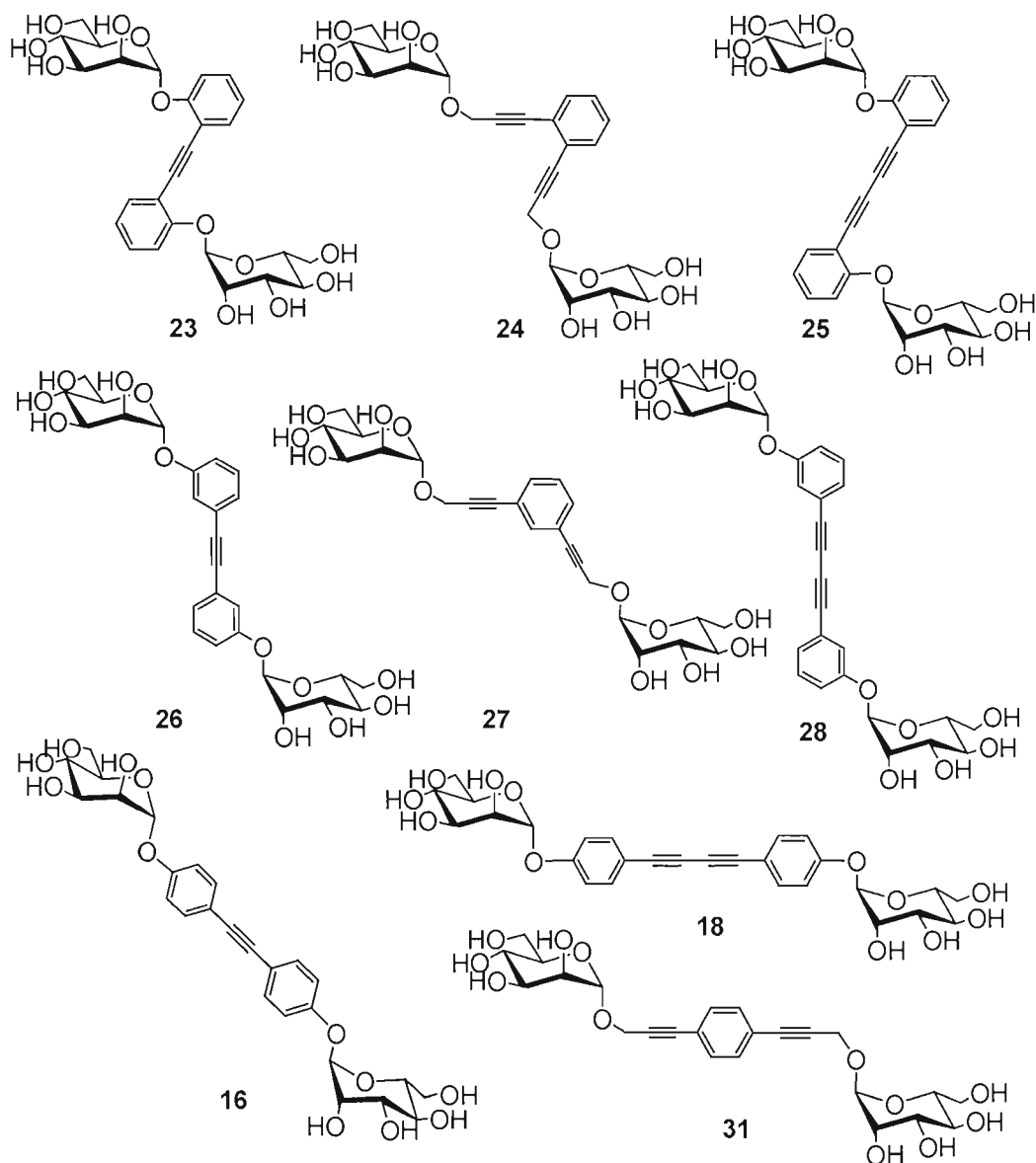
To initially test the optimum catalyst and cross-coupling conditions, treatment of *p*-iodophenyl mannoside **9** and propargyl mannoside **10** was attempted with tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) in DMF and triethylamine at 60°C to provide unsymmetrical dimer **11** in 98% yield (Scheme 3) (26). Quantitative de-*O*-acetylation under Zemplén conditions (NaOMe, MeOH) afforded dimer **12** in essentially quantitative yield. Then, treatment of **9** with (trimethylsilyl)acetylene, followed by removal of the silyl-protecting group under buffered conditions (HOAc) in THF afforded *p*-ethynylphenyl α -D-mannopyranoside **13** in 58% overall yield which after Zemplén treatment gave **14** quantitatively. Analogous handling on **19** and **21** gave **20** in only 10% yield and **22** in 55% yield (Scheme 4). An improved preparation of the *ortho* isomer **20** was achieved using dichlorobis(triphenylphosphine)palladium(II) ($\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$) in the presence of triphenylphosphine, copper(I) iodide and acetylene gas bubbled into the reaction mixture (DMF, Et_3N , 60°C, 44%).



Scheme 4 Structures of the *ortho*- and *meta*-aryl mannosides used in the cross-coupling reactions.

Homodimerization of aryl iodides (**9**, **19**, **21**) with an acetylene bridge was then conducted at room temperature ($\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, CuI, Et_3N , 24 h.) to provide

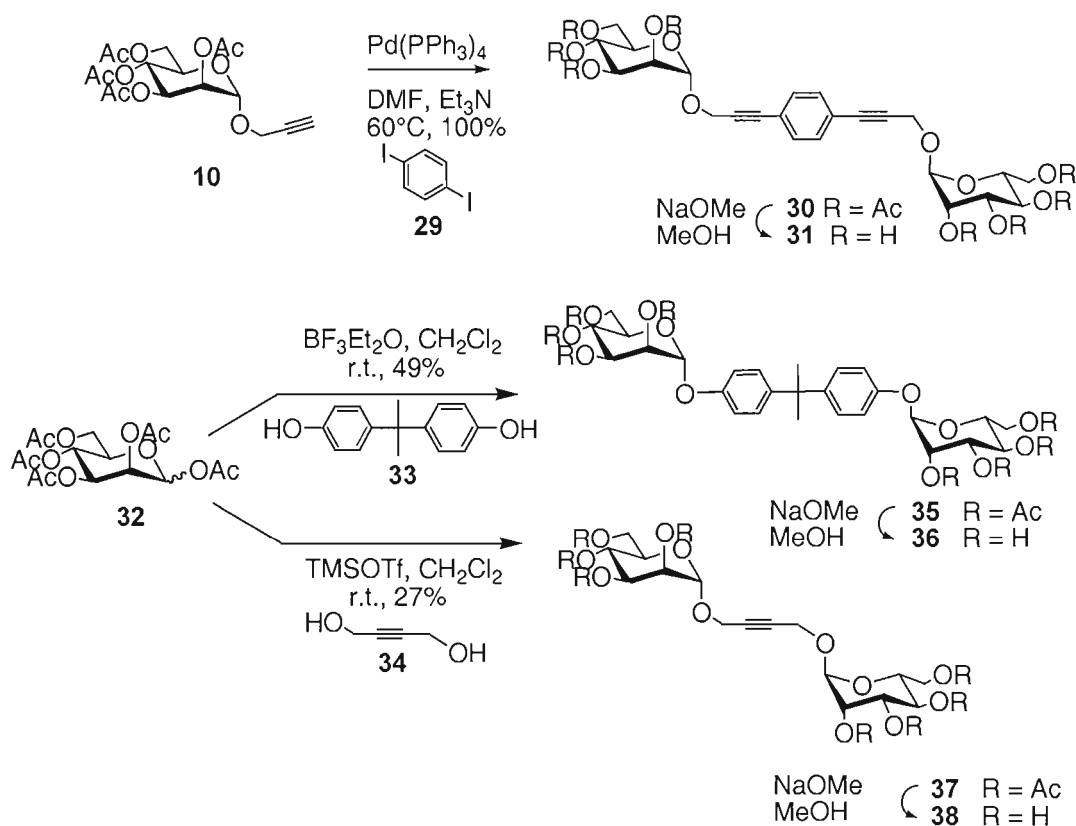
symmetrical dimer **15** (58%) accompanied by the acetylenic monomer **13** (27%). Attempts to provide the corresponding *ortho* and *meta* monoacetylene-bridged dimers **23** and **26** were troublesome since they were invariably contaminated with doubly bridged-dimers (**25**, **28**, Scheme 5) as inseparable mixtures (2:1 and 1:1.4 ratios, respectively). These compounds were obtained directly from **20** and **22** following an oxidative homocoupling in the presence of the copper catalyst. The situation was however remedied by using a cross-coupling strategy between the iodides and the ethynylphenyl mannosides in the absence of copper co-catalyst. Thus, treatment of **9** and **13**, **19** and **20**, and **21** and **22** ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Et_3N , DMF, 60°C , 24 h.) afforded the corresponding dimers after Zemplén deprotection (**16** (80%), **23** (100%), and **26** (100%)) as single products.



Scheme 5 Comparative structures of mannoside dimers prepared in this study.

Diacetylene-bridged dimers **18**, **25**, and **28** were more conveniently prepared (47-68% yields after Zemplén treatment) by a modified Glaser (27) oxidative homocoupling under Hay's conditions (28) of the corresponding ethynylphenyl mannosides using copper(II) acetate in refluxing pyridine (48 h.).

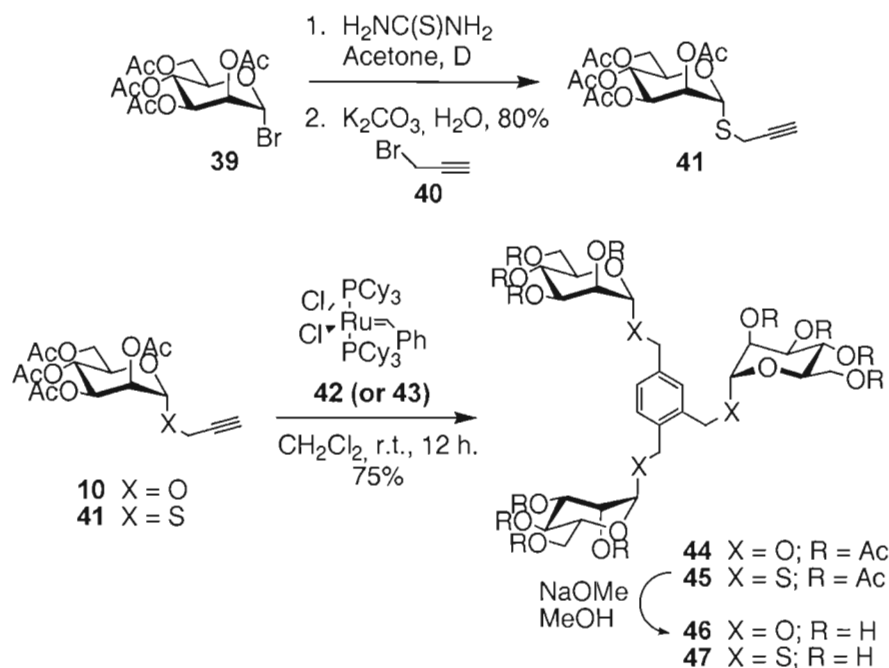
The syntheses of other dimers are also illustrated in Scheme 6. Thus, treatment of 2-propynyl α -D-mannopyranoside **10** with diiodobenzene (*para* isomer illustrated) under the optimum Sonogashira conditions described above provided **30** that after deprotection gave **31** in quantitative yield. For comparison purpose, dimer **36** and **38** (29) were prepared from peracetate **32** using bisphenol A (**33**) and 2-butyne-1,4-diol (**34**) under Lewis acid conditions (Scheme 6).



Scheme 6 Syntheses of other mannoside dimers using a tethering unit.

The human mannose-binding protein (hMBP) is a member of the collectin family of molecules that play a role in first line host defense. Found in the serum of many mammalian species (30), this protein mediates immunoglobulin-independent defensive reactions against pathogens. Its action occurs within minutes of exposure to an infectious agent providing immediate defense during the 1-3 days lag period required for induction of specific antibodies. The mannose-binding proteins function by recognizing oligo-mannose on the cell surface of various bacteria and viruses. They bind and neutralize them by complement-mediated cell lysis or facilitate their recognition by phagocytes.

Under unclear physiological conditions, the monomeric structure of the hMBP forms clusters of 18 identical subunits arranged as hexamer of trimers, adopting a bouquet-like structure (31). Each subunit chain consists of four distinct regions. The oligomerization is possible through the disulfide bonds in the cysteine-rich region and due to the characteristic properties of the collagen-like domain and the neck region. The clustering of three CRDs in close proximity significantly increases the affinity for glycoconjugates present on pathogens. In order to better understand the role and selectivity of this carbohydrate-binding protein in comparison to other mannoside-active proteins, it became of interest to synthesize other clusters composed of three and six α -D-mannopyranoside residues (Scheme 7 and 8).



Scheme 7 Single step synthesis of mannoside trimers using a novel Grubbs's catalyzed benzannulation reaction of O- and S-propargyl mannopyranosides.

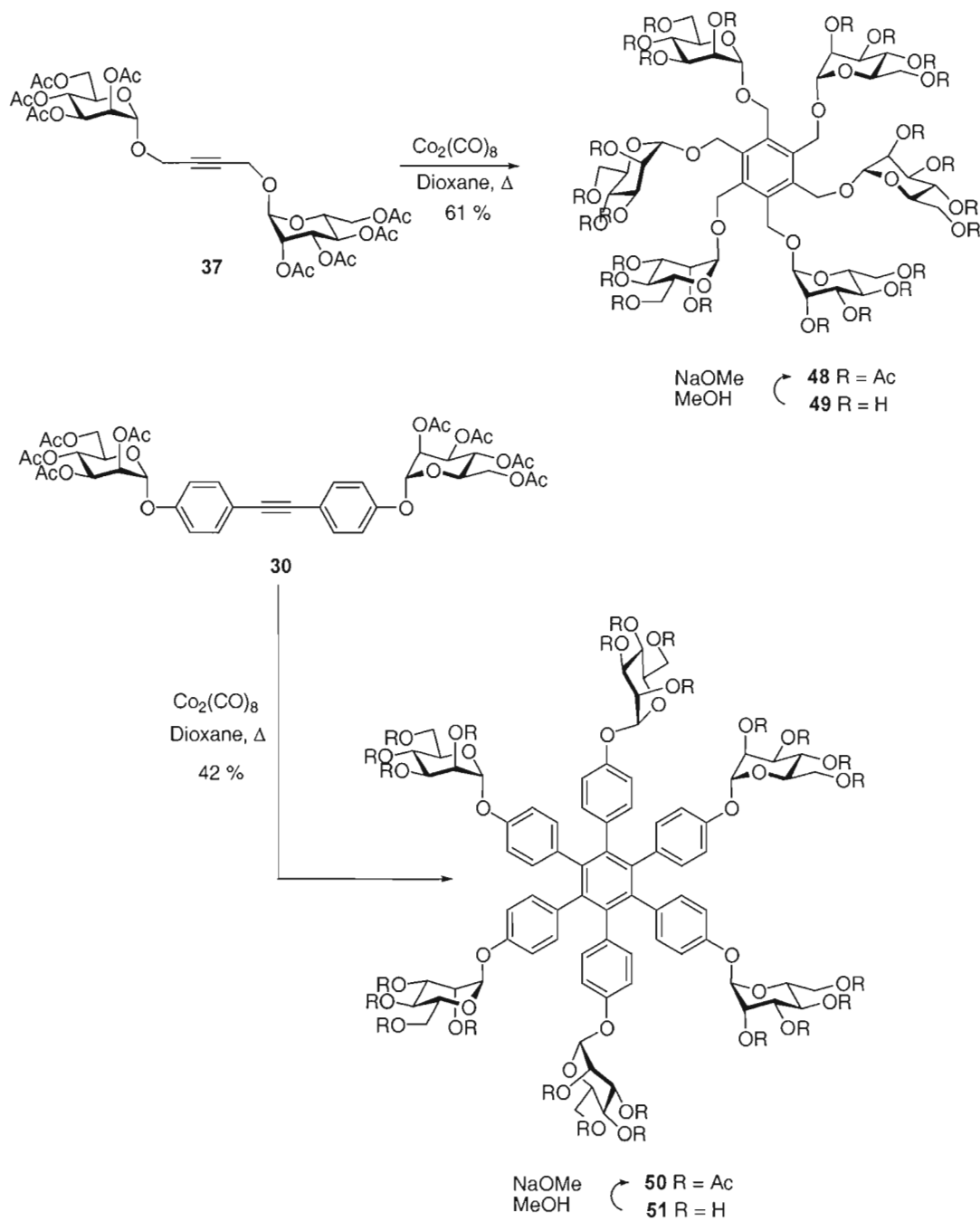
Benzannulation of three alkynes is a well-known process that is occurring in the presence of dicobalt octacarbonyl ($\text{Co}_2(\text{CO})_8$) (29, 32-34). To this end, we initially prepared O- and S-mannoside **10** and **41**, the latter being prepared from acetobromomannose **39** under standard conditions (35). Because the Grubbs' catalyst **42** or its second generation **43** (36) was known to be involved in ene-yne cross metathesis reactions (37), we had originally attempted to prepare mannoside analogs by cross-coupling **10** with various alkene derivatives. To our surprise, instead of reacting with its alkene partners, **10** preferred to react three consecutive times with itself to give good yield of a mixture (9:1) of regioisomeric benzannulated products, the major unsymmetrical isomer **44** being illustrated in Scheme 7 (38). This originally unexpected event was clearly the result of a [2+2+2] alkyne cyclotrimerization that is well-known to proceed with $\text{Co}_2(\text{CO})_8$. The same protocol

was also attempted on the thioglycoside **41** to afford **45**. Acetate deprotection (NaOMe, MeOH) afforded water-soluble trimers **46** and **47**.

To further expand the family of mannoside clusters obtainable from the alkyne derivatives, we also prepared cyclotrimerized hexamers using dicobalt octacarbonyl according to a known strategy (34). Thus dimer **37** and **30** were treated with $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ in refluxing dioxane to provide **48** and **50** in 61% and 42% yield, respectively (Scheme 8).

After Zemplén treatment under usual conditions, the sparingly water-soluble hexamers **49** and **51** were obtained in quantitative yields. Their modest solubility in water has however not jeopardized their biological evaluations in solid-phase competitive inhibition assays as well as in their cross-linking abilities with a model plant lectin, Concanavalin A, known to form cross-linked lattices in the presence of multiantennary glycans (39).

The relative ability of the above mannoside clusters to bind efficiently to a multivalent protein was evaluated using an adaptation of nephelometric assays (turbidimetry) (40). The tetrameric phytohemagglutinin from *Canavalia ensiformis* (Concanavalin A) was used as a model since its cross-linking ability in the presence of mannoside clusters is well-documented (39). Using microtiter plates (300 μL), incremental amount of the clusters were added to a fixed quantity of the lectin in phosphate buffer saline (PBS) and the turbidity was checked at time interval using absorbances at 490nm. The initial results were plotted as maximum binding as a function of time and indicated that dimer **16** was superior to trimer **46**. Trimer **49** failed to form a cross-linked lattice and hexamer **51** showed the best and fastest cross-linking ability. Using the best candidate **51** as standard normalized to 100% binding, the other clusters were similarly evaluated. The results are shown in Fig. 1.



Scheme 8 Alkyne cyclotrimerizations of **37** and **30** catalyzed by dicobalt octacarbonyl.

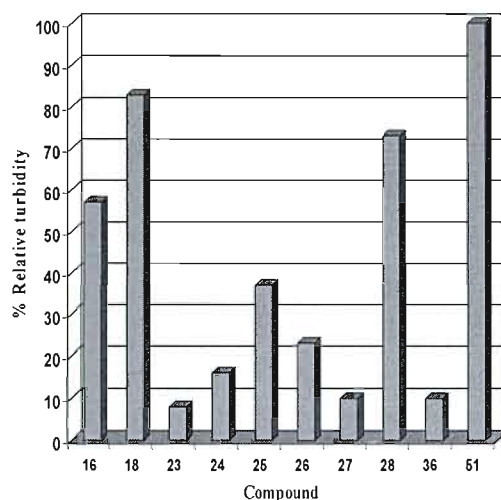


Fig. 1 Relative cross-linking ability of α -D-mannopyranoside clusters toward tetrameric Con A. Measurements were done in microtiter plates at 490 nm after 5 min. and standardized to the maximum binding of hexamer **51** at that time.

While most compounds could form insoluble cross-linked lattices very rapidly (except trimer **49**), dimers **18** and **28**, having the longest inter-mannoside distances showed to be the best candidates within the dimeric family of derivatives. For instance, dimer **18** was capable of precipitating 80% of the maximum value reached by the best candidate, hexamer **51**, after only 5 min. Interestingly, most *ortho*- and some *meta*-substituted dimers, having short distances between the sugar residues, were the slowest to form stable insoluble lattices. It is however noteworthy to mention that after prolonged reaction time (up to 70 min.), most candidates succeeded in attaining constant absorbance, albeit with lower values, therefore indicating that the cross-linking phenomena are under dynamic equilibrium processes and that some clusters could organize the lattice at faster rates than other analogs.

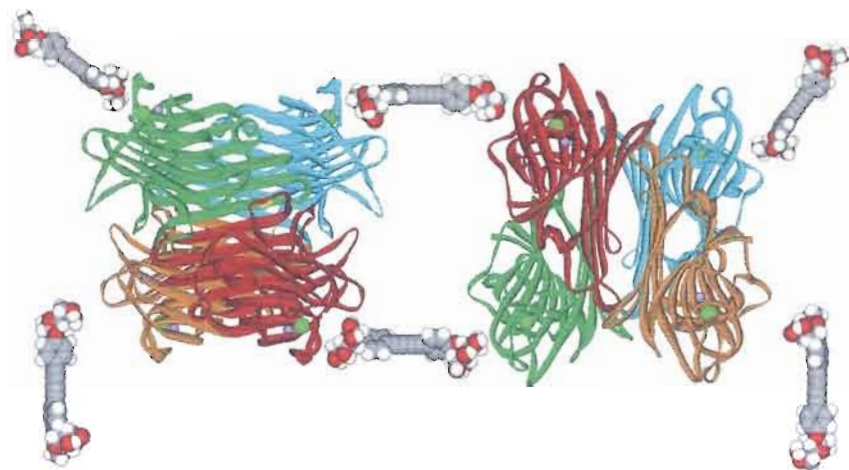


Fig. 2 Schematic representation of Concanavalin A lectin tetramer forming a cross-linked lattice with dimer **18**.

A schematic representation of the cross-linked behavior of the best dimeric candidate (**18**) is illustrated (Fig. 2). The hypothetical lattice structure shown was based on the general behavior of natural (*39*) as well as non-natural (*41*) mannosides. The above cross-linking process is suggested to be analogous to the one used by nature to provide high selectivity and affinity within, otherwise similar carbohydrate ligands.

Experimental

Hexakis-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)hexaphenylbenzene (50**).** A solution of bis-*para*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)diphenyl-acetylene (**30**) (0.35 g, 0.40 mmol) in 5 mL freshly distilled 1,4-dioxane was refluxed under a stream of N_2 gas. After 5 minutes of reflux, dicobalt octacarbonyl ($Co_2(CO)_8$) (0.019 g, 0.056 mmol) was added. The reaction

mixture was refluxed for a further 24 hours, after which time, the reaction was judged complete by TLC on silica gel (ethyl acetate/ toluene 6.4: 1.5, v:v). The solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel using hexane/ ethyl acetate 1:4 as eluent. The cyclotrimerized product was obtained as a yellow crystalline powder (0.14 g, 42 % yield); m.p. 85 °C; IR 2940, 1750, 1435, 1371, 1226 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ (ppm) 6.62 (C_6H_4 , d, $J=8.7$ Hz, 12H), 6.58 (C_6H_4 , d, $J=8.5$ Hz, 12H), 5.40 (H-3, dd, $J_{2,3}=3.7$ Hz, $J_{3,4}=10.0$ Hz, 6H), 5.26 (H-2, H-4, dd, $J=9.7$ Hz, $J=10.7$ Hz, 12H), 5.24 (H-1, s, 6H), 4.20 (H-6a, dd, $J_{5,6a}=5.2$ Hz, $J_{6a,6b}=12.5$ Hz, 6H), 3.93 (H-5, H-6b, m, 12H), 2.10, 2.00, 1.99, 1.98, 1.94 (2x) (COCH_3 , 72H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.7 MHz): δ (ppm) 170.3, 169.8, 169.7, 169.7, (C=O), 153.3, 139.9, 135.3, 132.3, 115.2 (C_6H_4), 96.0 (C-1), 69.4, 69.2, 69.0, 68.8 (C-2, C-3, C-5), 65.8 (C-4), 20.9, 20.7, 20.6 (COCH_3); FAB-MS $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z (rel. intensity %) calcd for $\text{C}_{126}\text{H}_{138}\text{O}_{60}$: 2649.74; found: 2650.70 (0.1).

Acknowledgements

We are thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for partial support of this work. We also thank Dr. S. K. Das for useful suggestions and assistance.

2.3.3 References

- 1 Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- 2 Bovin, N. V.; Gabius, H.-J. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 413-421.
- 3 Roy, R. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1996**, *8*, 79-99.
- 4 Kiessling, L. L.; Pohl, N. L. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 71-77.
- 5 Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.
- 6 Roy, R. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, *15*, 291-310.
- 7 Röckendorf, N.; Lindhorst, T. K. *Topics Curr. Chem.* **2001**, *217*, 201-238.
- 8 Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F. *Rev. Molecul Biotechnol.* **2002**, *90*, 231-255.
- 9 Nagahori, N.; Lee, R. T.; Nishimura, S.-I.; Pagé, D.; Roy, R.; Lee, Y. C. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 836-844.
- 10 Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327.
- 11 Dam, T. K.; Roy, R.; Pagé, D.; Brewer, C. F. *Biochemistry* **2002**, *41*, 1351-1358.
- 12 Sharon, N. *FEBS Letters* **1987**, *217*, 145-157.
- 13 Arya, P.; Kutterer, K. M. K.; Qin, H.; Roby, J.; Barnes, M. L.; Kim, J.-M.; Roy, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1127-1132.
- 14 Vrasidas, I.; André, S.; Valentini, P.; Böck, C.; Lensch, M.; Kaltner, H.; Liskamp, R. M. J.; Gabius, Hans-J.; Pieters, R. J. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 803-810.
- 15 Sörme, P.; Qian, Y.; Nyholm, P.-G.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 183-189.
- 16 André, S.; Liu, B.; Gabius, H.-J.; Roy, R. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3909-3916.

- 17 Zaccai, N. R.; Maenaka, K.; Maenaka, T.; Crocker, P. R.; Brossmer, R.; Kelm, S.; Jones, E. Y. *Structure* **2003**, *11*, 557-567.
- 18 Stahl, P. D. *Curr. Opin. Immunol.* **1992**, *4*, 49-52.
- 19 Seddiki, N.; Rabehi, L.; Benjouad, A.; Saffar, L.; Ferriere, F.; Gluckman, J.-C.; Gattegno, L. *Glycobiology* **1997**, *7*, 1229-1236.
- 20 Pagé, D.; Roy, R. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 714-723.
- 21 Pagé, D.; Zanini, D.; Roy, R. *Biorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1949-1961.
- 22 Pagé, D.; Roy, R. *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 345-356.
- 23 Sonogashira, K. In Diederich, F. and Stang, P. J., Eds.; *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*; Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1998; pp 203-209.
- 24 Das, S. A.; Trono, M. C.; Roy, R. *Methods Enzymol.* **2003**, *362*, 3-17.
- 25 Mereyala, H. B.; Gurralla, S. R. *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 351-354.
- 26 Roy, R.; Das, S. K.; Santoyo-González, F.; Hernández-Mateo, F.; Dam, T. K.; Brewer, C. F. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1757-1762.
- 27 For a review: Siemsen, P.; Livingston, R. C.; Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2632-2657.
- 28 Hay, A. S. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3320-3321.
- 29 Kaufman, R. J.; Sidhu, R. S. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4941-4947.
- 30 Epstein, J.; Eichbaum, Q.; Sheriff, S.; Ezekowitz, R. A. B. *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, *8*, 29-35.
- 31 Kawasaki, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 186-195.
- 32 Saito, S.; Yamamoto, Y. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2901-2915.
- 33 Roy, R.; Das, S. K.; Dominique, R.; Trono, M. C.; Hernández-Mateo, F.; Santoyo-González, F. *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 565-571.
- 34 Dominique, R.; Liu, B.; Das, S. K.; Roy, R. *Synthesis* **2000**, *6*, 862-868.

- 35 Gan, Z.; Roy, R. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1155-1158.
- 36 Grubbs, R. H.; Chang, S. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4413-4450.
- 37 Fürstner, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3012-3043.
- 38 Das S. K.; Roy, R. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4015-4018.
- 39 Dam, T. K.; Brewer, C. F.; *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387-429.
- 40 Pagé, D.; Roy, R. *Int. J. Biochrom.* **1996**, *3*, 231-244.
- 41 Moothoo, D. N.; McMahon, S..A.; Dimick, S. M.; Toone, E. J.; Naismith, J. *Acta Crystal. D: Biol. Crystal.* **1998**, *D54*, 1023-1025.

2.4 A first QSAR model for Galectin-3 glycomimetic inhibitors based on 3D docked structures

Suzanne Sirois*, Denis Giguère, René Roy

Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Succ.
Centre-Ville Ville, Montréal Québec, Canada H3C 3P8

Soumis pour le périodique : *Medicinal Chemsitry* en décembre 2005.

2.4.1 Résumé

Les galectines sont une famille de 14 différents membres et constituent une importante cible thérapeutique en raison de tous les rôles qu'on leur attribue (inflammation, immunité, cancer). Près de 136 inhibiteurs de la galectine-3 ont été synthétisés jusqu'à maintenant et l'utilisation de toutes les structures moléculaires sont suffisantes pour le développement d'un modèle QSAR des glycomimétiques de la galectine-3. Ce modèle prototype guidera le développement de nouveaux inhibiteurs de la galectine-3.

Des méthodes numériques quantitatives ont été utilisées, telles que PLS et ANN. Elles ont été utilisées et comparées au model QSAR pour établir une corrélation entre les propriétés moléculaires et l'affinité (K_d). La structure moléculaire et la valeur d'inhibition (K_d) ont été obtenues à partir de la littérature.

Des descripteurs moléculaires ont été sélectionnés avec l'approche PLS de contingence, ANN, PCA et GA pour la meilleure prédiction des affinités d'inhibitions de la galectine-3. Finalement, 56, 31 et 35 descripteurs ont été obtenus avec PLS, PCA et ANN respectivement.

L'étude réalisée suggère que les types PEOE et FF sont d'importants descripteurs qui sont reliés directement à la distribution de la charge en relation avec l'énergie enthalpique et l'hydrophobe. Ces éléments devraient être tenus en compte pour le développement de nouveaux inhibiteurs de la galectine-3. Les interactions non-covalentes telles que la lipophilie et la structure de l'inhibiteur sont des points importants pour l'obtention d'un inhibiteur sélectif de la galectine-3.

2.4.2 Manuscript

This study presents the first QSAR model for Galectin-3 glycomimetic inhibitors based on docked structures to the carbohydrate recognition domain (CRD). Quantitative numerical methods such as PLS (Partial Least Squares) and ANN (Artificial Neural Networks) have been used and compared on QSAR models to establish correlations between molecular properties and binding affinity values (Kd). Training and validation of QSAR predictive models was performed on a master dataset consisting of 136 compounds. The molecular structures and binding affinities (Kd) (136 compounds) were obtained from the literature. To address the issue of dimensionality reduction, molecular descriptors were selected with PLS contingency approach, ANN, PCA (Principal Component Analysis) and GA (Genetic Algorithms) for the best predictive Galectin-3 binding affinity (Kd). Final sets comprising 56, 31 and 35 descriptors were obtained with PLS, PCA and ANN, respectively.

Galectins¹ are a family of 14 protein members that constitute important targets for therapeutics development because of their newly identified role in inflammation², immunity³ and cancer⁴⁻⁷. The particularity of galectin-3 (Gal-3) as compared to the other members of the galectin family is its monomeric nature in solution. Very few inhibitor design have been made until now⁸ for this lectin member. Recently, three high resolution X-ray crystal structures for the human Gal-3 in complex with LacNac: 1A3K, 1KJL and 1KJR^{9,10} have been resolved. These Gal-3/ligand complexe structures can serve as template for a structure-based rational design of novel classes of inhibitors. In general, galectins share similar carbohydrate recognition domains (CRDs) and affinity for small β -D-galactosides, but show significant differences in binding specificity for more complex glycoconjugates. In Gal-3 CRD, the majority of interactions are made between the galactoside residue and

His158, Asn160 and Arg162 (see Figure 1). Direct hydrogen bonding to the protein occurs mostly through galactoside O-3'axial hydroxyl group. Two residues with planar-side chains, Trp181 and His158, are important to align the sugar correctly in the binding site. In particular, Trp181 participates in stacking interactions with carbons C3, C4 and C5 of the galactoside residue. Also, Gal-3 resolution of X-ray crystal structures revealed that three OH groups of the galactoside residue point towards an extension of the lactose/LacNac (N-acetyllactosamine) binding site⁹. This is thought to be responsible for conferring selectivity for longer oligosaccharides. Taking advantage of this particular feature, chemical modifications of LacNac derivatives were made by Sorme and al.¹⁰⁻¹³ at the critical C-3'position of the galactoside moiety using a benzamide pattern template. Another class of compound, O-galactosyl aldoximes¹⁴, have also moderate potency as compared to the LacNac derivatives. Following this, another class of inhibitors has been investigated based on thio- β -D-galactopyranoside template¹⁵. Taken all together, the amount of available molecular structures, 136 published in total to date, was sufficient to enable the development of a first QSAR Gal-3 glycomimetics model. This prototype QSAR model is serving as a first guideline for the design of novel and potent Gal-3 selective inhibitors¹⁶.

Intuitively, molecular entities should possess specific features, which classify them into drugs or non-drugs¹⁷. First and foremost, these features have to be specific to their target. Thus, drugs are subdivided into antiviral, antiretroviral, antibiotics, antineoplastics, etc. Secondly, the structural, physical and chemical features of a particular class of compounds should be related to its biological activity as well as the binding interaction which encompasses molecular recognition between the ligand and the receptor. Characterizing a class of molecule to a specific activity is another major challenge in drug identification and optimization¹⁸.

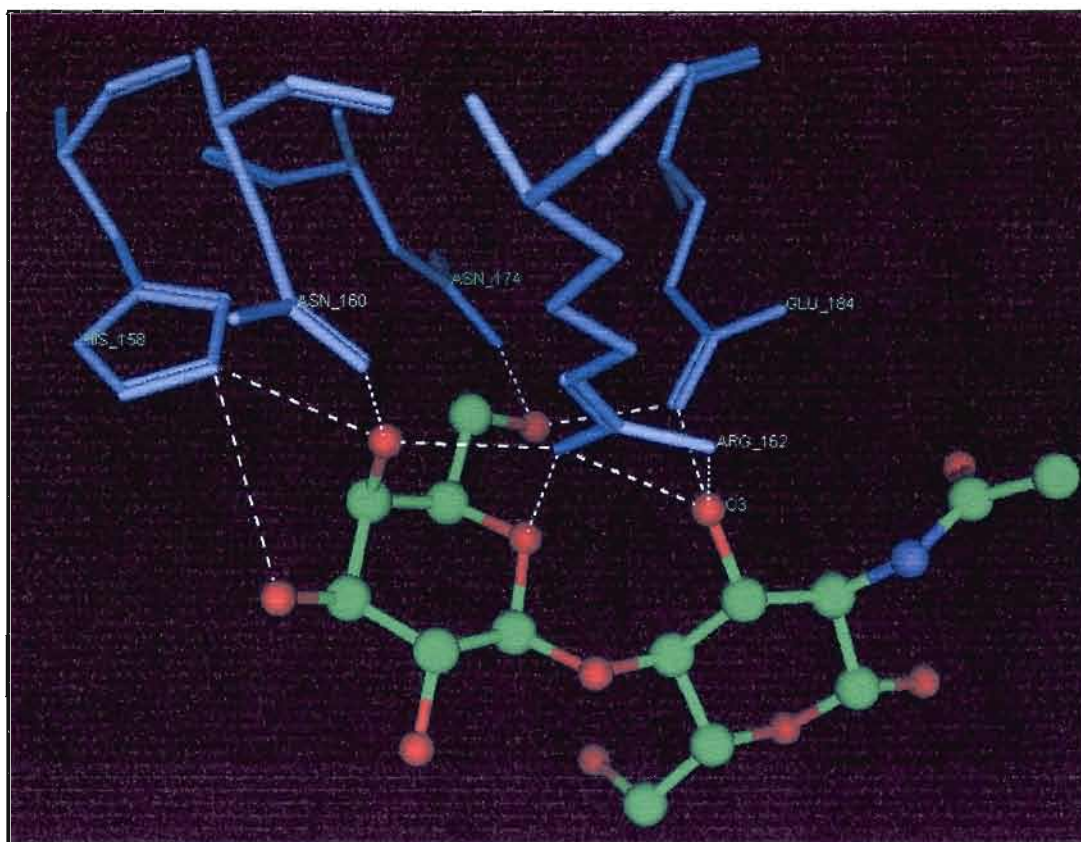


Figure 1 Hydrogen bond network between LacNac and Galectin-3.

The pharmaceutical industry routinely uses classical approaches based on: 1) High Throughput Screening (HTS) for identifying new class of compound^{19,20} and 2) Linear Quantitative Structure Activity relationship (QSAR) for optimizing lead candidates²¹⁻²⁵. The latter consists primarily of correlations of an activity with a single point change made at a particular position while keeping all the other positions constant. Most commonly used QSAR statistical approaches are primarily linear methods that correlates the changes at these specific points and do not take into account non-linear effects in the overall molecule potency. Furthermore, these methods are of a reductionism nature because interrelations between the various types of descriptors are excluded from the analysis. For a candidate molecule to be

considered as an inhibitor for a specific target it has to attain a threshold experimental value in the range of the nanomolar (nM) concentration. However, the structural, chemical and physical characteristics leading to this threshold value have to be defined. Several characteristics can be considered individually as per the classical QSAR approach^{21,26-28}. However, the synergistic effect of these characteristics is greater than that of their individual contribution. The complexity of these interrelations differentiates a potent inhibitor versus a non-potent one. The approach that is taken therein find its justification on the Critical Path Initiative (CPI) put in place recently by the FDA which demands a rationale approach for a fast and accurate means of predicting the biological properties of small molecules to be developed since prototyping is both expensive and time consuming²⁹. The price tag for the development of a new drug can go as high as \$800 million. It follows that green chemistry is becoming more and more a principle for the twenty first century. Within this green context approach compounds are designed and tested virtually before being synthesized. This rational approach not only permits economy of time and money but more importantly the avoidance of the uses of chemical materials that will need to be wasted eventually or recycled³⁰⁻³³. Thus, rational approaches encompass designing, synthesising and testing, instead of synthesizing, testing and designing. For this purpose hybrid QSAR-ANN is used to predict the complex inhibition activity of new molecules that belong to a particular class of compounds. Consequently, a non-linear-QSAR approach to galectin-3 inhibitors is developed and presented.

Taking together, the design of small affinity galectins inhibitors is a new and exciting challenge because of its high potential of applications in improving human health. Carbohydrates are notorious for being poor drugs because of their *in vivo* hydrolysis and their failure to cross membrane due to high polarity. Synthesis of low molecular weight (MW), high affinity, monovalent and multivalent ligands presents an important challenge. In the case of non-O-linked monosaccharide derivatives they may possess a longer half-life *in vivo*, due to lack of hydrolytically labile glycosidic

bonds, are less polar which in turn improved cell permeability. Hence, disaccharide glycomimetics with modification of glycosidic bonds is an avenue of intense development. At the molecular level the challenge lies in understanding the interactions between the lectin and the saccharide through the complex networks of hydrogen-bonds as well as hydrophobic and Van der Waals interactions. For this, the first objective is to provide a rationale means for the modeling of the various types of interactions responsible for inhibitory activity of newly synthesized compounds.

Materials and Methods

A typical QSAR table is composed of rows representing the molecules and columns representing descriptor values. The process of building a predictive model from experimental data can be generalized as follow²⁸:

1. Assemble a database of experimental results and molecular structures.
2. Optimize molecular structures in 3D space.
3. Calculate molecular descriptors for each molecule in the training set.
4. Estimate the parameters of a chosen numerical model (PLS, ANN, PCA).
5. Remove outliers from the training set
6. Assess the predictability of the model. If the model is not satisfactory, return to step 4, or add new structures if available.

Galectin-3 glycomimetics database: Training set

Surface plasmon resonance experimental binding affinity K_d values of 136 Gal-3 inhibitors was obtained from literature^{10,14,15}. Each structure was constructed with the Molecular Operating Environment (MOE)³⁴ and then minimized on LacNac

and LacNac-Bek gabarit in order to restraint the domain of conformational flexibilities to those of the complexed ligands (see Figure 2). (LacNac-Bek is the name of the ligand given by Sorme and al. in the PDB file 1KJR). This rational approach is justifiable in the context that the CRD allows only one specific type of anchorage for the galactoside residue of the carbohydrate based on the observations obtained from various galectins X-ray structures^{9,10}, PDB number 1KJL and 1KJL.

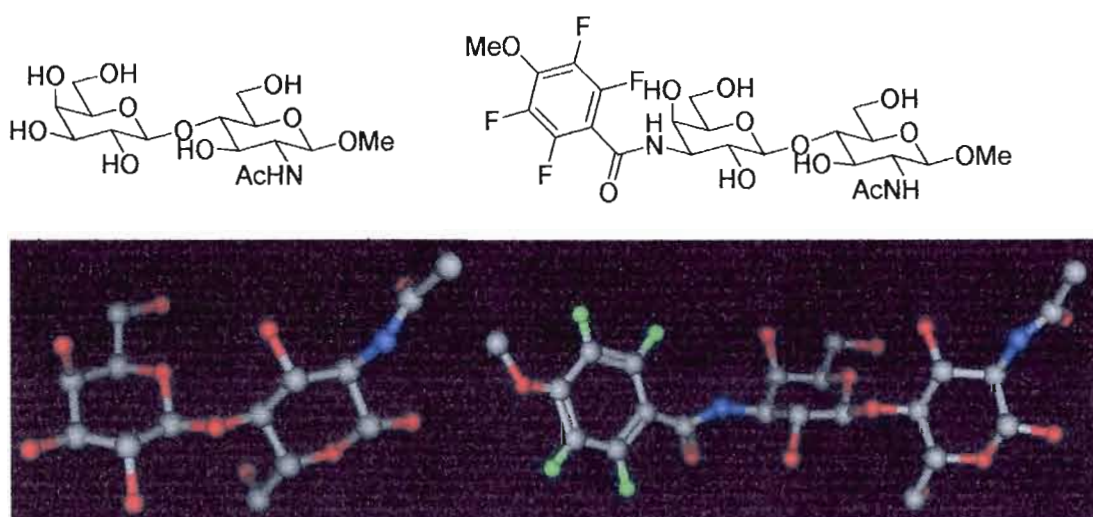


Figure 2 Top Left: 1KJL- LacNac $K_d = 69\,000\text{ mM}$; Right: 1KJR- LacNac-BEK $K_d = 0.88\text{ mM}$ Bottom: 3D structures of complexed ligands. Left LacNac, right LacNac-BEK

Molecular descriptors calculations

Numerical representation of molecules is described with n -vectors of numbers called molecular descriptors. Molecular descriptors, initially more than 155, were generated from the minimized molecular structures in Gal-3 pocket on the basis of 1D, 2D and 3D formulas. The descriptor types used to represent the molecular structure belong to the structural, topological, physical and chemical domains.

Choice of Mathematical Model

PLS: is a linear model in which the experimental result is expressed as a linear combination of the descriptors plus a constant. The parameters, or coefficients, for the model are determined in such a way that the mean squared error between the training sets experimental results and the models results is minimized. Given a matrix $X_{n \times p}$ that contains n observations of p descriptors, and a matrix $Y_{n \times m}$ that contains n observations of m dependent variables, the goal of PLS is to allow to form a model that will describe their common structure and allow for the prediction of Y from X (for novel observations in X) [10]. Essentially, PLS tries to solve the system:

$$(1) Y_{n \times m} = X_{n \times p} B_{p \times m} + E_{n \times m}$$

Where n : number of observations, m : number of dependent variables (in our case, $m=1$ since we are only predicting K_d), p : number of descriptors, E is the error residual matrix and B is the regression coefficient matrix (whose determination leads to the formation of a predictive model).

ANN: it is said that ANN “mimic” brain function³⁵. ANN, as any other artificial intelligence method, inherently uses learning. This is achieved through an initial training session at the end of which internal associations - relating patterns of inputs and outputs - are built. Subsequently, ANN can make a prediction based on new inputs or “unknowns”. In feedforward neural networks, the neurons are organized in the form of layers. The neurons in a layer get input from the previous layer and feed their output to the next layer. In this kind of networks connections to the neurons in the same or previous layers are not permitted. The last layer of neurons is called the output layer and the layers between the input and output layers are called the hidden layers. The input layer is made up of special input neurons, transmitting only the applied external input to their outputs. In a network if there is only the layer of input nodes and a single layer of neurons constituting the output layer then they are called single layer network. If there are one or more hidden layers, such networks are called multilayer networks (MLP). The MLP³⁵, in general, is the most popular network

structure. It is dependent on iterative training (slow in cases) but it produces networks that are compact and fast in their execution (following training). We tested MLPs with 3 or 4 layers, featuring the hyperbolic tangent as activation function interconnecting these layers. Radial basis function³⁶ (RBF) networks originate from the regularization theory for solving ill-conditioned problems. They tend to perform slower than MLPs but they train fast. Conversely to the MLPs, the effectiveness of RBF is inversely proportional to the increasing number of input variables. However, inclusion of unnecessary inputs makes them more sensitive which may have an indicative value in unexploited datasets like ours. Generalized regression neural networks³⁷ (GRNN) train fast (when $N < 1000$ approximately) and perform satisfactorily, yet they execute slowly. GRNNs augment the pros and cons of RBFs thus contrasting MLPs. GRNNs use Bayesian techniques to estimate the expected value of an output variable dependent on a given input.

Selection of Molecular Descriptors

Within the framework of a linear QSAR model (PLS), contingency analysis was performed to assist in the selection of subsets of descriptors from a set of more than 155 descriptors to complement the 38-VSA descriptors³⁴. The VSA set of descriptors are Subdivided Surface Areas descriptors based on an approximate accessible van der Waals surface area. QSAR-contingency performs a bivariate contingency analysis for each descriptor and the activity or property value³⁴. Contingency analysis attempts to measure the degree to which two random variables are dependent.

QSAR Models

QSAR models were developed based on the suggested descriptors from the contingency analysis. Finally, the relative importance of each descriptor is obtained from the absolute values of the normalized coefficients divided by the absolute value of the largest normalized coefficient. The quality of the linear-based model is assessed with r^2 : correlation coefficient, and RMSE: root mean square error.

Validation of the model is made with:

- \$PRED a value of the model,
- \$RES the difference between the value of the model and the activity field (log (Kd)),
- \$Z-SCORE the absolute difference between the value of the model and the activity field (log (Kd)), divided by the square root of the mean square error of the data set

Cross-Prediction is obtained with:

- \$XPRED the value of the model under a leave-one-out cross validation scheme
- \$XRES the difference between the value of the model under a leave-one-out cross validation scheme and the activity field
- \$XZ-SCORE the absolute difference between the value of the model under a leave-one-out cross validation scheme and the activity field (log (Kd)), divided by the square root of the mean square error of the data set.

The two Z-Score fields \$Z-SCORE and \$XZ-SCORE can be thought of as the number of standard deviations away from the mean and are used for outlier detection.

Results and Discussion

The two most challenging steps for developing a QSAR model are the selection of a set of training compounds having sufficient molecular diversity and the selection of an appropriate set of molecular descriptors describing the activity.

DataSet training compounds

A first molecular database of 119 compounds have been built from literature available affinity Kd data. They comprise 59 compounds with C-3' position based on a benzamide pattern template¹⁰, 52 compounds with C-1' based on O-galactosyl aldoximes¹⁴ and 8 compounds with thio- β -D-galactopyranoside template¹⁵. These compounds were synthesized with the following rationale. Replacement of N-acetyl glucosamine by a non-carbohydrate aglycon to render more drug-like with higher affinity; thioglycosides: to confer stability towards acidic and enzymatic hydrolysis; anomeric oxime ethers: to improve stability against enzymatic hydrolysis: i.e. stable at physiological pH. Then, 17 more compounds were added to the initial database and they comprised 12 triazol-1thio-galactosides¹⁵ and 5 C2-symmetrical thiogalactoside bis-benzamido derivatives³⁸, for a total of 136 compounds.

Molecular descriptors selection

Molecular descriptors selection is intimately related with accuracy, stability and interpretability of a model. There are so many thousands descriptors available that the selection of an appropriate set is nowadays dependent on the type of mathematical model, algorithm used and class of drug target. Within that context

Labute³⁹ has developed a set of descriptors for wide applications. These descriptors are based upon atomic contributions to Van derWaals area, logP (octanol/water), molar refractivity and partial charge. From these contributions three sets of descriptors have been defined: SlogP_VSA (10) , SMR_VSA (8) and PEOE_VSA (14) which captured hydrophilic and hydrophobic effects, polarisability, and electrostatic interactions, respectively. According to Labute, each of these descriptor sets is derived from the Hansch and Leo descriptors²⁵ and taken all together they define a 32 dimensional chemistry space. Six more VSA-types descriptors are also added which represents the partial charges Q_VSA-type.

Table 1 shows the validity of the QSAR models based initially on the 38-VSA descriptors set. QSAR PLS-based models produce very good correlation and cross-correlation coefficients but fail for cross-correlation RMSE deviation for a training set of 119 compounds with a value of 1.78298. Adding more compounds to the training dataset improve slightly cross-correlation RMSE deviation: 1.78298 versus 1.76659 for 119 and 136 compounds, respectively. This suggests that linear QSAR model based on VSA descriptors set is insufficient to describe the binding affinity of glycomimetics to their binding sites. Different domains of descriptor types needed to be explored. For this purpose, force-field types were selected after performing contingency analysis on various descriptor domains (see Table 2). The predictive capacity of the model was improved giving a cross-validated RMSE of 1.45851. Hence, PLS-contingency method was applied to produce the best possible PLS model with RMSE and r^2 correlation coefficient and cross –correlation values of 0.65408, 0.96337, 1.03636 and 0.90939, respectively. PCA, GA, and contingency-based methods were used subsequently to identify other categories of descriptors from a set of 155 descriptors (see Table 2). The 31 descriptors set obtained with GA produced a PLS model with RMSE and r^2 correlation coefficient and cross –correlation values of 0.90278, 0.94399 1.07127 and 0.80876, respectively. The 17 descriptors set obtained with PCA produced a model with RMSE and r^2 correlation coefficient and cross –

correlation values of 0.89581, 0.92098, 1.10385 and 0.96062, respectively. For this ensemble of Gal-3 glycomimetic derivatives, PLS-contingency produces a very good model, followed by the GA approach and then by PCA. Regarding the molecular descriptors, force-field charge descriptors based on PEF95SAC force field⁴⁰ were amongst the highest ranked. It is important to mention that this force field has been specifically developed to model carbohydrates and alcohols. The *ab initio* charges used in the force field are quite similar to those used in most established water potentials. PEF95SAC is based on Consistent Force Field (CFF) optimized potential energy parameters for alcohols and most naturally occurring carbohydrates and has been applied to and tested on β -lactose. Hence, descriptors selection involving charge components is very dependent on the choice of the force field made. Traditionally, QSAR statistical methods - like PLS and Principal Component Analysis (PCA) - are used in drug design and optimization. PLS methods are limited in describing the inherent non-linearity between the descriptors because they are of a reductionism nature and do not take into account inter-correlations.

Table 1 Comparison of r^2 correlation coefficient for both models PLS and NN using GA for molecular descriptors selection.

#descriptors / # compounds	RMSE	r^2 Correlation coefficient	RMSE Cross- Validated	r^2 Cross- Validated
38/119 PLS	0.9736	0.91532	1.78298	0.74002
44/119 PLS	0.8872	0.92968	1.58980	0.79679
81/119 PLS	0.7378	0.95099	2.64724	0.55579
38/129 PLS	1.0435	0.897975	1.59498	0.77162
81/129 PLS	0.77437	0.94388	1.81190	0.74006
38/136 PLS	1.17578	0.881626	1.76659	0.74188
66/136 PLS	0.80366	0.94251	1.59166	0.81689
81/136 PLS	0.83729	0.96359	1.45851	0.65207
56/136Contingency	0.65408	0.96337	1.03636	0.90939
31/136 GA	0.90278	0.94399	1.07127	0.80876
17/136 PCA	0.89581	0.92098	1.10385	0.96062
#descriptors / # compounds	RMSE	r^2 Correlation coefficient	RMSE Cross- Validated	r^2 Cross- Validated
35/136 GA and NN	0.8107606	0.9554546	0.3748076	0.9899365
35/136 GA and NN	0.7698428	0.9593227	0.5226707	0.9829417
35/136 GA and NN	0.5657788	0.9787421	0.7049245	0.9375967
35/136 GA and NN	1.099722	0.9268441	0.6359181	0.9626615
35/136 GA and NN	1.152485	0.9056143	0.4901789	0.9878652
35/136 GA and NN	0.7285886	0.9645584	0.8220331	0.9292236
35/136 GA and NN	0.6313888	0.9688487	0.9416063	0.9326992
35/136 GA and NN	0.7631699	0.9597963	0.5527562	0.9760612

Table 2 Set of type of descriptors and the total number for each set.

Descriptor type sets	Number of descriptors
PEOE	19
SLOGP	11
SMR	8
Total	38
FF	18
PM3	7
Vsa	3
Total	66
Q_VSA	5
dipole	4
vdw	2
diameter	1
radius	1
bpol	1
a_IC	1
mr	1
a_hyd	1
rgyr	1
ASA	1
TPSA	1
Total	86
Inductive ¹⁵	50
ASA_	4
Lipinski	2
SMB	5
directional	3
various	5
Total	155

ANN/GA

One method that has gained popularity recently is the one based on GA and ANN. For this purpose, a combine ANN/GA methodology was applied to both the selection of a reduced minimal set of descriptors from the 56 suggested by the PLS-contingency analysis and to the development of an improved model. GA/ANN suggested a subset of 35 descriptors which has been evaluated on 10 random split sets of the master dataset of 136 compounds consisting of 110/26 training/validating. To address the non-linear nature of data, we tested different structures of ANN i.e. multi layer perceptron (MLP) with 3 or 4 layers, radial basis function (RBF), and generalized regression neural networks (GRNN). Often a number of variables may carry - to some extent - the same information as other variables. This problem is known as multi-collinearity and the only remedy known is to decrease the dimensionality of the problem in question by selecting only the most significant variables in relation to the predicted outcome. Genetic algorithms and neural networks used in combination to identify the most significant descriptors of the compounds in the training and validating split datasets have demonstrated its strength as compared to linear approach such as PLS described above. As anticipated, combination applications of GA and ANN on the split datasets suggested a ranking of significance for each one of the chemical descriptors (see Table 3).

Table 3 Relative importance of the 35 selected molecular descriptors.

Abbreviation	Descriptors	Ranking		
		Average	Min	Max
	Partial Equalization of Orbital			
PEOE ¹ _VSA_+3	Electronegativities. Sum of v_i where q_i is in the range [0.15,0.20)	2,2	1	3
SLOGP_VSA2	Sum of v_i such that L_i is in (-0.2,0]	3,6	2	7
SLOGP_VSA0	Sum of v_i such that $L_i \leq -0.4$	3,8	1	12
	Binned VDW surface area descriptors			
FF_VSA-4	based on forcefield charges. Total negative 4 vdw surface area	7,2	2	15
DIAMETER	Molecular diameter	7,4	1	21
A_HYD	Number of hydrophobic atoms	8,8	7	10
	Partial Equalization of Orbital			
PEOE_VSA+4	Electronegativities Sum of v_i where q_i is in the range [0.20,0.25).	13	5	23
	The heat of formation (kcal/mol) calculated using the PM3 Hamiltonian [MOPAC]			
PM3_HF		13,8	5	27
	Binned VDW surface area descriptors			
FF_VSA_HYD	based on forcefield charges. Total hydrophobic vdw surface area	14,6	9	25
	Partial Equalization of Orbital			
PEOE_VSA-3	Electronegativities Sum of v_i where q_i is in the range [-0.20,-0.15)	14,8	10	20
SMR_VSA0	Sum of v_i such that R_i is in [0,0.11]	15	5	27
SMR_VSA3	Sum of v_i such that R_i is in (0.35,0.39]	15,2	3	26
	Binned VDW surface area descriptors			
FF_VSA_NEG	based on forcefield charges. Total negative vdw surface area.	15,4	7	27
	Water accessible surface area calculated using a radius of 1.4 Å for the water molecule.			
ASA		16	8	31
VDW_VOL	Van der Waals volume	16,2	4	35
SMR	Molecular refractivity	17,4	8	27
	Partial Equalization of Orbital			
PEOE_VSA_POL	Electronegativities	18,4	7	34
RADIUS	Molecular radius	18,4	12	28
SUM_HRD	Sum of hardness of all atoms in molecule	18,6	6	33

¹ PEOE: Let q_i denote the partial charge of atom i as defined above. Let v_i be the van der Waals surface area of atom i (as calculated by a connection table approximation).

Table 3 Relative importance of the 35 selected molecular descriptors.

Abbreviation	Descriptors	Ranking		
		Average	Min	Max
SMPSSGMM	Sum of all positive Sigma (mol->atom) in molecule	20	7	28
LOGP_O_W	Log of the octanol/water partition coefficient	20	4	29
SMR_VSA1	Sum of v_i such that R_i is in (0.11,0.26]	20,6	9	32
Q_VSA_POL	Total polar van der Waals surface area	20,6	12	26
FF_VSA+1	Binned VDW surface area descriptors based on forcefield charges. Total positive 1 vdw surface area'	21,6	12	30
SLOGP_VSA4	Sum of v_i such that L_i is in (0.1,0.15] Partial Equalization of Orbital	22	15	29
PEOE_VSA_+2	Electronegativities Sum of v_i where q_i is in the range [0.10,0.15) Partial Equalization of Orbital	22,6	13	32
PEOE_VSA_+1	Electronegativities Sum of v_i where q_i is in the range [0.05,0.10)	24,2	14	32
SLOGP_VSA_8	Sum of v_i such that L_i is in (0.30,0.40]	24,4	15	33
FF_VSA_POL	Total polar vdw surface area based on forcefield charges	25,6	14	32
TPSA	Total polar surface area	26,4	17	35
FF_VSA_-3	Total negative 3 vdw surface area	26,6	18	35
PM3_E	The total energy (kcal/mol) calculated using the PM3 Hamiltonian [MOPAC].	26,6	19	34
SLOGP_VSA_9	Sum of v_i such that $L_i > 0.40$	29	21	34
Q_VSA_POS	Total polar van der Waals positive	29,4	19	35
FF_VSA_+2	Total positive 2 vdw surface area	30,6	24	35

¹ PEOE: Let q_i denote the partial charge of atom i as defined above. Let v_i be the van der Waals surface area of atom i (as calculated by a connection table approximation).

This study's objective is to identify and select a set of molecular descriptors for a universal glycomimetic class of Gal-3 inhibitors rather than focusing on a particular subclass at a particular position modification. The notion of relevance to receptor affinity of a collection of descriptors is difficult to quantify and our analysis is based on the ranking and the kind of descriptors suggested by ANN. Suggested descriptors belong to the original 38-VSA types in combination with others and they are describing: **1)** physical properties such as heat of formation (kcal/mol) and total energy calculated using the PM3 Hamiltonian (PM3_HF and PM3-E), log of the octanol/water partition coefficient (log (o/w): logP), polar surface area calculated using group contributions to approximate the polar surface area from connection table information only (TPSA) **2)** surface area descriptors based on force field charges (FF_VSA), volume and shape descriptors such as water accessible surface area calculated using a radius of 1.4 Å for the water molecule (ASA), Van der Waals volume (VDW_VOL) **3)** distance matrix descriptors such as molecular diameter and radius **4)** pharmacophore atom type descriptors such as number of hydrophobic atoms (A_HYD) **5)** finally, the sum of hardness of all atoms in molecule (SUM_HARD).

Direct Electrostatic Contributions

Recent work [31] has suggested that the underlying atomic contributions to partial charge, molar refractivity and logP are relevant to receptor affinity. The PEOE_VSA (Partial Equalization of Orbital Electronegativities⁴¹) are intended to capture direct electrostatic interactions. The PEOE method of calculating charges is an iterative method in which charge is transferred between bonded atoms until equilibrium. Although the notion of partial charges is widely used it is an intellectual concept because it depends on the model and the manners the whole electron distribution in a molecule is divided. What is important to see at this point is the contribution of the charge distribution within the context of glycomimetics. For this,

PEOE and FF types are important descriptors which encapsulate charge distribution and this is directly related to enthalpic energy contributions.

Hydrophobicity (lipophilicity)

Hydrophobicity and water solubility are properties which are used as early as ADME screens^{22,42} to reject probable development failures early on stage. Study findings suggested that hydrophobicity is an important contributor that controls the binding activity of Gal-3 inhibitors. Non-covalent interactions such as lipophilicity and shape of the molecule account for most of the activity against Gal-3. In drug design the thermodynamic binding of a drug to its therapeutic target includes free energy of binding, enthalpy and entropy. Enthalpy contribution is expressed through the drug-target interaction relative to the solvent. The primary contribution comes from hydrogen bonding and Van der Waals interactions. Entropy contribution is primarily due to hydrophobic interactions caused by an increase in the solvent entropy from burial of hydrophobic groups of the drugs and by release of water molecules upon binding and also from a small loss of conformational degrees of freedom of the candidate molecule. A drug with favorable entropy indicates that the binding is driven by hydrophobic interactions and low hydrogen bond formation. This type of drugs is hydrophobic and poorly water soluble and are also conformationally restraint. This entails that they lack a potential of adaptability and consequently are highly susceptible to cause drug resistance⁴³ and side effects²⁸.

Binding affinity prediction

Electrostatic interactions such as hydrogen bonding between the Gal-3 and its

natural ligand lactose occur between the O-3 hydroxyl group and surrounding groups Arg 162 and Glu184 (Figure 3): and the endocyclic oxygen of galactoside moiety. These interactions create a network of three salt bridges which are a common feature in carbohydrate-lectin recognitions. Semi-empirical calculations correlate the modifications done at the anomeric position with the charge density on the O-3 oxygen¹⁶.

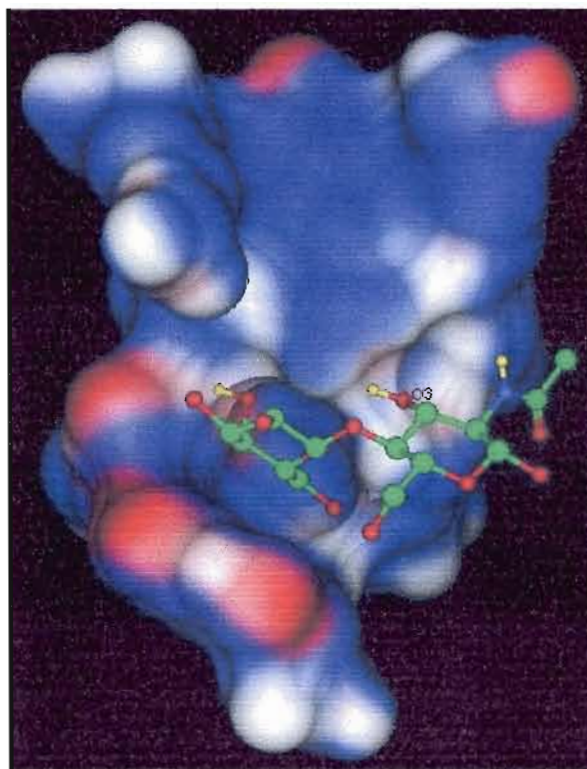


Figure 3 Connolly surface using a space grid of 0.75 colored by Active Lone Pair showing the CRD pocket and O-3 into an hydrogen-bonding network. The bleu regions are hydrophobic, the red are hydrophilic while the white regions through which hydrogen bonds are likely to form for novel Galectin-3 inhibitors.

Conclusion

Study findings suggested that PEOE and FF types are important descriptors which encapsulate charge distribution which is directly related to enthalpic energy contributions and also hydrophobicity is an important contributor that controls the binding activity of Gal-3 inhibitors. Non-covalent interactions such as lipophilicity and shape of the molecule account for most of the activity against Gal-3. High affinity and selectivity, synthetic accessibility, no chemically reactive group, oral bioavailability, favorable pharmacokinetics, metabolism, elimination pathway, lack of side effects, lack of toxic effects are currently considered in a way for the drug development process of novel glycomimetics Gal-3 inhibitors with emphasis on modification at both C-3' and at O-3 positions¹⁶ work in progress.

Acknowledgements

This work was supported from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and a Canadian Research Chair Therapeutic Chemistry to RR.

2.4.3 References:

- 1 Barondes, S. H.; Castronovo, V.; Cooper, D. N.; Cummings, R. D.; Drickamer, K.; Feizi, T.; Gitt, M. A.; Hirabayashi, J.; Hughes, C.; Kasai, K.; et al. *Cell* **1994**, *76*, 597-8.
- 2 Almkvist, J.; Karlsson, A. *Glycoconj J* **2004**, *19*, 575-81.
- 3 Sato, S.; Nieminen, J. *Glycoconj J* **2004**, *19*, 583-91.
- 4 Rabinovich, G. A.; Baum, L. G.; Tinari, N.; Paganelli, R.; Natoli, C.; Liu, F. T.; Iacobelli, S. *Trends Immunol* **2002**, *23*, 313-20.
- 5 Nakahara, S.; Oka, N.; Raz, A. *Apoptosis* **2005**, *10*, 267-75.
- 6 Rabinovich, G. A.; Cumashi, A.; Bianco, G. A.; Ciavardelli, D.; Iurisci, I.; D'Egidio, M.; Piccolo, E.; Tinari, N.; Nifantiev, N.; Iacobelli, S. *Glycobiology* **2005**.
- 7 Hsu, D. K.; Liu, F. T. *Glycoconj J* **2004**, *19*, 507-15.
- 8 Morris, S.; Ahmad, N.; Andre, S.; Kaltner, H.; Gabius, H. J.; Brenowitz, M.; Brewer, F. *Glycobiology* **2004**, *14*, 293-300.
- 9 Seetharaman, J.; Kanigsberg, A.; Slaaby, R.; Leffler, H.; Barondes, S. H.; Rini, J. M. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 13047-52.
- 10 Sorme, P.; Arnoux, P.; Kahl-Knutsson, B.; Leffler, H.; Rini, J. M.; Nilsson, U. J. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 1737-43.
- 11 Sorme, P.; Qian, Y.; Nyholm, P. G.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Chembiochem* **2002**, *3*, 183-9.
- 12 Sorme, P.; Kahl-Knutsson, B.; Huflejt, M.; Nilsson, U. J.; Leffler, H. *Anal Biochem* **2004**, *334*, 36-47.
- 13 Sorme, P.; Kahl-Knutson, B.; Wellmar, U.; Nilsson, U. J.; Leffler, H. *Methods Enzymol* **2003**, *362*, 504-12.
- 14 Tejler, J.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 2343-5.

- 15 Cumpstey, I.; Carlsson, S.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Org Biomol Chem* **2005**, *3*, 1922-32.
- 16 Giguère, D.; Sato, S.; St-Pierre, C.; Sirois, S.; Roy, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1668-72
- 17 Sirois, S.; Hatzakis, G.; Wei, D.; Du, Q.; Chou, K. C. *Comput Biol Chem* **2005**, *29*, 55-67.
- 18 Burke, M. D.; Berger, E. M.; Schreiber, S. L. *Science* **2003**, *302*, 613-8.
- 19 Blanchard, J. E.; Elowe, N. H.; Huitema, C.; Fortin, P. D.; Cechetto, J. D.; Eltis, L. D.; Brown, E. D. *Chem Biol* **2004**, *11*, 1445-53.
- 20 Kevorkov, D.; Makarenkov, V. *J Biomol Screen* **2005**, *10*, 557-67.
- 21 Verma, R. P.; Hansch, C. *Bioorg Med Chem* **2005**.
- 22 Hansch, C.; Leo, A.; Mekapati, S. B.; Kurup, A. *Bioorg Med Chem* **2004**, *12*, 3391-400.
- 23 Hansch, C.; Steinmetz, W. E.; Leo, A. J.; Mekapati, S. B.; Kurup, A.; Hoekman, D. *J Chem Inf Comput Sci* **2003**, *43*, 120-5.
- 24 Hansch, C.; Hoekman, D.; Leo, A.; Weininger, D.; Selassie, C. D. *Chem Rev* **2002**, *102*, 783-812.
- 25 Leo, A.; Hansch, C.; Church, C. *J Med Chem* **1969**, *12*, 766-71.
- 26 Verma, R. P.; Mekapati, S. B.; Kurup, A.; Hansch, C. *Bioorg Med Chem* **2005**, *13*, 5508-26.
- 27 Hansch, C.; Verma, R. P.; Kurup, A.; Mekapati, S. B. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 2149-57.
- 28 Sirois, S.; Wei, D. Q.; Tsoukas, C. M.; Chou, K.-C.; Hatzakis, G. E. *Med. Chem* **2005**, *1*, 173-184.
- 29 CPI, Critical Path Initiative <http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/>.
- 30 Wei, D.; Zhang, R.; Du, Q.; Gao, W.; Li, Y.; Gao, H.; Wang, S.-Q.; Zhang, X.; Li, A.-X.; Sirois, S.; Chou, K. C. *Amino Acids* **2005**, *accepted*.

- 31 Du, Q.; Wang, S.; Wei, D.; Sirois, S.; Chou, K. C. *Anal Biochem* **2005**, *337*, 262-70.
- 32 Sirois, S.; Sing, T.; Chou, K. C. *Protein and Peptide Science* **2005**, *6*, 413-422.
- 33 Sirois, S.; Wei, D. Q.; Du, Q.; Chou, K. C. *J Chem Inf Comput Sci* **2004**, *44*, 1111-22.
- 34 MOE 2005.04, C. C. G. I. S. S. W. S. M., Québec, Canada h3A 2R7 Montreal, 2005.
- 35 Lippmann, R. P.; Shahian, D. M. *Ann Thorac Surg* **1997**, *63*, 1635-43.
- 36 Bang, S. Y.; Hwang, Y. S. *Neural Netw* **1997**, *10*, 1495-1503.
- 37 Mosier, P. D.; Jurs, P. C. *J Chem Inf Comput Sci* **2002**, *42*, 1460-70.
- 38 Cumpstey, I.; Sundin, A.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 5110-2.
- 39 Labute, P. *J Mol Graph Model* **2000**, *18*, 464-77.
- 40 Fabricius, J.; Englesen, S. B.; Rasmussen, K. J. *Carbo. Chem.* **1997**, *16*, 751-772.
- 41 Gasteiger, M.; Marsili, J. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3219.
- 42 Li, A. P. *Drug Discov Today* **2001**, *6*, 357-366.
- 43 Ohtaka, H.; Velazquez-Campoy, A.; Xie, D.; Freire, E. *Protein Sci* **2002**, *11*, 1908-16.
- 44 Cherkasov, A.; Shi, Z.; Fallahi, M.; Hammond, G. L. *J Med Chem* **2005**, *48*, 3203-13.

CHAPITRE III

CONCLUSIONS

Pour conclure, le domaine des galectines est en pleine effervescence et la quantité de recherches publiées a augmenté de façon drastique, depuis les cinq dernières années. Le nombre d'équipes de recherches travaillant dans ce domaine montre tout l'intérêt et l'importance de cette famille de lectine. De plus en plus de rôles biologiques leurs sont attribués et le développement de bons inhibiteurs sélectifs pourrait mener à des traitements anti-cancer, anti-inflammatoire ou même anti-VIH.

Notre contribution à la recherche se situe au niveau de la synthèse d'analogues de galactosides ou lactosides possédant une sélectivité et spécificité pour une galectine bien déterminée. Les réactions utilisées pour faire la synthèse des analogues ont été simples et efficaces. Nous avons exploité la glycosylation catalysé par transfert de phase pour faire la synthèse de *O*- et *S*-aryle galacto- et lactopyranoside. Cette réaction peut être utilisée pour faire la synthèse de différents types d'aglycones, par exemple électroattracteurs pour diminuer la densité électronique sur l'oxygène en position-3. Cette étude a permis de mieux comprendre l'importance de l'oxygène en position-3 de l'unité glucoside et ouvre maintenant la voie pour l'inhibition sélective de la galectine-1.

Par la suite, la formation d'hétérocycles non-naturels via la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire ou d'oxydes de nitriles a montré l'importance de ces composés pour le développement de molécules biologiquement actives. Ceux-ci sont stables en milieu physiologique et peuvent interagir avec la lectine de façon à créer des interactions favorables : ponts hydrogènes, interactions hydrophobes, *etc.* La synthèse de cette série d'analogues a montré la facilité de synthèse des triazoles et les

possibilités pour introduire ces derniers à différentes positions sur le glycoside. Nous avons des structures « lead » potentiels pour l'élaboration rapide d'une deuxième génération d'analogues. Le meilleur inhibiteur s'est avéré être le composé trivalent étant le produit d'une triple réactions de cycloaddition. La qualité des informations obtenus par les évaluations avec les lectines ouvre la voie pour l'élaboration de nouvelles molécules C_3 -symétriques avec des lactosides ou galactosides possédant des modifications en position-3'.

Les résultats de recherche de la section 4 du chapitre 2 ont permis de comprendre l'utilité des espaceurs rigides pour l'inhibition d'une lectine. L'utilisation de catalyseurs métalliques est un outil puissant pour la synthèse rapide d'analogues mono- et multivalents. La rigidité des espaceurs peut être important au point de vue de la thermodynamique et représente un concept non négligeable pour le développement d'un médicament.

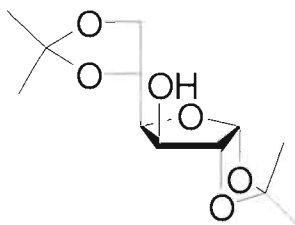
L'élaboration du premier modèle QSAR de la galectine-3 a été réalisée en collaboration avec Dr. Suzanne Sirois. Cette étude a permis de cibler les propriétés structurales clés pour l'obtention d'un inhibiteur possédant une grande affinité pour la galectine-3. Les interactions non-covalentes telles que hydrophobe sont des facteurs plus importants pour l'inhibition sélective de la galectine-3.

La synthèse d'inhibiteurs possédant un azoture en position-3' est présentement en cours et nous a permis de comprendre la sélectivité de la réaction de cycloaddition-1,3 dipolaire de Sharpless. Les résultats sont trop préliminaires pour en faire l'élaboration dans ce mémoire. Beaucoup de résultats obtenus n'ont pu être présentés dans ce mémoire parce que les évaluations avec les galectines ne sont pas terminées. Tous les composés testés par le groupe de Sato ont aussi été testés par le groupe de Gabius en Allemagne. Leurs évaluations permettront d'obtenir des résultats plus précis (IC_{50}) et les analogues seront aussi soumis à des essais cellulaires. Les

meilleurs composés seront envoyés à l'équipe de Brewer à New York pour des évaluations ITC. Finalement la synthèse de mutants rationnels de certaines galectines pourrait permettre une meilleure compréhension du site actif de la lectine et une meilleure compréhension des interactions ligand/récepteur. La combinaison de toutes ces données avec modélisation moléculaire pourraient mener à des résultats assez impressionnant! D'autres résultats ont été obtenus en collaboration avec le Dr. Sirois et seront présentés dans un avenir rapproché. Finalement, l'élaboration d'une méthode utilisant la chimie sur phase solide est présentement en cours dans nos laboratoires pour le développement plus rapide d'une très grande librairie d'inhibiteurs des galectines.

ANNEXE

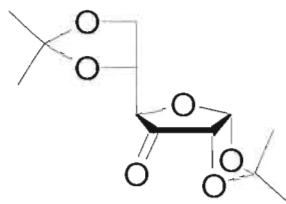
Toutes les caractéristiques physiques des composés **33-38**¹ et de **1**, **41**, **32**² et de **20-22**³ sont comparables avec celles de la littérature et décrites dans leurs références appropriées.



1,2: 5,6-Di-*O*-isopropylidène- α -D-glucofuranose **33**:

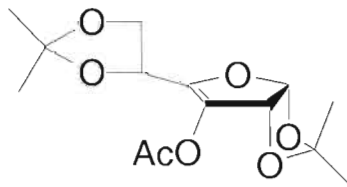
De l' α -D-glucose (20g, 111.0 mmol) a été agité vigoureusement dans un mélange d'acétone (400 mL) et de sève moléculaire 4Å (5 g) à 0°C. L'acide sulfurique concentré (16 mL) a été ajouté par petites portions dans le but de maintenir la température entre 5 et 10 °C. Après 3 heures d'agitation, la solution a été plongée dans un bain de glace et une solution de NaOH (24.5 g dans 30 mL d'eau) a été ajoutée jusqu'à neutralité. Les sels ont été décantés toute la nuit et au matin, la solution a été filtrée et concentrée sous pression réduite. Le mélange a été dissous dans le CHCl₃ (50 mL) et lavé avec de l'eau (3 fois 40 mL) et la phase aqueuse lavée avec du CHCl₃ (3 fois 40 mL). Les phases aqueuses contiennent le sous-produit. Les phases organiques ont été combinées, concentrées sous pression réduite et recristallisées dans le cyclohexane pour obtenir un solide blanc cristallin dans un rendement de 38 % (10.9 g). p. f. = 105 °C; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.95 (1H, d, J = 3.57 Hz, H-1), 4.53 (1H, dd, J = 3.6 Hz, H-2), 4.33 (2H, m, H-5, H-6), 4.17 (1H, dd, J = 6.5, 8.8 Hz, H-3), 4.07 (dd, J = 2.7, 7.4 Hz, H-6), 3.98 (1H, dd, J = 5.2, 8.5 Hz, H-4), 2.31 (1H, s, OH), 1.51, 1.45, 1.37, 1.33 (12H, 4s, CH₃); ¹³C RMN (75

MHz, CDCl_3): δ 111.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 109.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 105.2 (C-1), 85.0 (C-2), 81.1 (C-4), 75.1 (C-5), 73.3 (C-3), 67.6 (C-6), 26.8, 26.7, 26.1, 25.1 (4 CH_3).



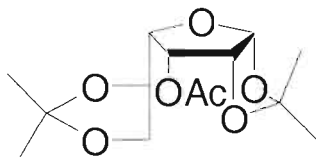
1,2: 5,6-Di-*O*-isopropylidène- α -D-ribo-hexofuranose-3-ulose **34**:

Une solution de **33** (1.00g, 3.84 mmol), de sève moléculaire 4-Å (4.00g) et de dichlorométhane (38 mL) a été agitée pendant 15 minutes à la température de la pièce. Le PCC (1.66 g, 7.68 mmol) a été ajouté et la réaction orangée a été agitée jusqu'à la disparition du produit de départ (2 heures). Le mélange brunâtre a été concentré sous pression réduite et un mélange 1:1 (diéthyle éther : éther de pétrole) a été ajouté et agité pendant 20 minutes. La solution a été filtrée sur silice et la silice a été lavée à plusieurs reprises avec de l'éther (5 fois 15 mL). La solution organique résultante a été concentrée sous pression réduite pour obtenir un solide blanc dans un rendement de 87% (0.862 g). Après analyse RMN, le produit était assez pur pour être utilisé dans la prochaine étape. Il est à noter que la présence du diol géminale était visible par RMN. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 6.14 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-1), 4.40-4.35 (3H, m, H-2, H-5, H-4), 4.00-4.04 (2H, m, H-6), 1.51, 1.45, 1.37, 1.33 (12 H, 4s, CH_3).



3'-*O*-Acetyl-1,2: 5,6-di-*O*-isopropylidène- α -D-érythro-hex-3-énofuranose **35**:

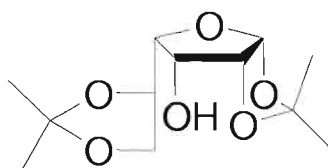
Une solution de **34** (3.05 g, 11.81 mmol), de pyridine (25.6 mL) et d'anhydride acétique (12.8 mL) a été agitée à 75°C pendant 17 heures et après ce temps des morceaux de glaces et de l'acétate d'éthyle (20 mL) ont été ajoutés au mélange. La phase aqueuse a été lavée avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 15 mL) et les phases organiques combinées ont été lavées avec une solution saturée de NaHCO₃ (3 fois 15 mL), de l'eau (3 fois 15 mL) et de la saumure (3 fois 15 mL). La solution organique a été séchée avec le Na₂SO₄, filtrée, concentrée sous pression réduite et chromatographiée sur gel de silice avec un mélange 1:1 (acétate d'éthyle : hexane). L'huile claire instable a été obtenue dans un rendement de 91% (3.22 g) et doit être entreposée à 5 °C pendant un maximum de deux semaines. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6.04 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-1), 5.40 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-2), 4.71 (1H, dd, *J* = 6.3, 12.6 Hz, H-5), 4.09-4.06 (2H, m, H-6), 2.22 (3H, s, COCH₃), 1.54, 1.48, 1.46, 1.39 (12H, 4s, CH₃); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 168.9 (COCH₃), 145.2 (C-4), 129.0 (C-3), 118.4 (C(CH₃)₂), 113.4 (C(CH₃)₂), 110.4 (C-1), 80.8 (C-2), 68.6 (C-5), 65.9 (C-6), 27.9, 27.8, 25.7, 25.6 (4 CH₃), 20.5 (COCH₃).



1,2: 5,6-Di-*O*-isopropylidène-3-acétyl- α -D-gulofuranose **36**:

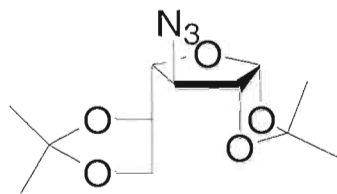
L'ester d'énol **35** (1.10 g, 3.66 mmol) a été dissout dans le méthanol (37 mL) et du Pd/C (0.11 g) a été ajouté à la solution. L'hydrogène gazeux a été barboté dans le mélange réactionnel pendant une heure. Après ce temps, le mélange noir a été filtré sur « celite » et a été concentré sous pression réduite. Le produit a été directement purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (1:2, acétate d'éthyle : hexane) pour obtenir **36** dans un rendement de 78 % (0.863 g) sous forme d'un solide blanc. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.79 (1H, d, *J* = 4.1 Hz, H-1), 5.05 (1H, dd, *J* =

5.5, 6.6 Hz, H-3), 4.78 (1H, dd, $J = 4.1, 5.5$ Hz, H-2), 4.59 (1H, dt, $J = 4.7, 7.1$, H-5), 4.05 (2H, m, H-4, H-6a), 3.51 (1H, dd, $J = 7.1, 8.2$ Hz, H-6b), 2.11 (3H, s, COCH_3), 1.55, 1.42, 1.36, 1.33 (12H, 4s, CH_3); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 169.5 (COCH_3), 114.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 109.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 104.9 (C-1), 81.2 (C-2), 78.3 (C-4), 75.0 (C-3), 71.6 (C-5), 66.2 (C-6), 26.6, 26.5, 25.1 (4 CH_3), 20.4 (COCH_3).



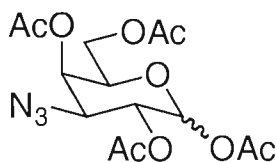
1,2: 5,6-Di-*O*-isopropylidène- α -D-gulofuranose **37**:

L'acétate **36** (1.01 g, 3.34 mmol) a été dissout dans le méthanol (33 mL) et une solution de méthoxyde de sodium (1 M) a été ajoutée jusqu'à l'obtention d'un pH de 8.5. Après disparition du produit de départ (1 heure), de la résine acide (Dowex 50W-X8) a été ajoutée jusqu'à neutralité. Le mélange a été filtré et concentré sous pression réduite et utilisé sans autre purification. Le composé **37** est un solide blanc et a été obtenu dans un rendement quantitatif (0.869 g). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5.79 (1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-1), 4.67 (1H, $J = 4.1, 6.3$ Hz, H-2), 4.47 (dt, $J = 5.4, 7.1$ Hz, H-5), 4.26-4.20 (2H, m, H-3, H-6a), 3.91 (1H, dd, $J = 5.4, 8.5$ Hz, H-6b), 3.72 (1H, dd, $J = 7.1, 8.5$ Hz, H-4), 2.65 (1H, d, $J = 6.59$, OH), 2.17, 1.46, 1.44, 1.39 (12H, 4s, CH_3); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 114.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 109.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 105.2 (C-1), 84.2 (C-2), 79.8 (C-4), 75.4 (C-5), 69.6 (C-3), 66.3 (C-6), 27.0, 26.6, 25.1 (4 CH_3).



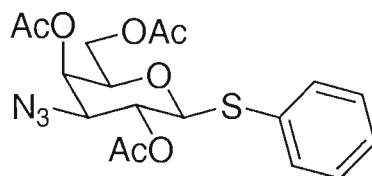
3-Azido-3-déoxy-1 : 2,5 : 6-di-*O*-isopropylidène- α -D-galactofuranose **38**:

À une solution de l'alcool **37** (1.03 g, 3.96 mmol) dans un mélange DCM-pyridine (19:1, 40 mL) à 0°C, a été ajouté goûte-à-goute de l'anhydride triflique (2.83 mL, 16.8 mmol) dans le DCM (2 mL). Après disparition du produit de départ (15 minutes), le mélange a été extrait avec une solution froide de 5% HCl (3 fois 15 mL) et d'eau (3 fois 15 mL). Par la suite, la phase organique a été séchée avec du Na₂SO₄ et concentrée sous pression réduite pour l'obtention d'un liquide orange. Le produit brut a été directement dissous dans le DMF (100 mL), refroidi à 0°C et l'azoture de sodium (1.29 g, 19.8 mmol) a été ajouté. Après une agitation de 2 heures à la température de la pièce, le mélange a été dissout dans le DCM (20 mL) et lavé avec de l'eau (3 fois 15 mL) et de la saumure (3 fois 15 mL). Les phases organiques combinées ont été séchées avec du Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le résidu a été chromatographié sur gel de silice avec un mélange 6:1 (hexane : acétate d'éthyle) pour donner **38** sous forme d'une huile claire dans un rendement de 62 %. IR (CHCl₃) 2106 cm⁻¹, N₃; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.76 (1H, d, J = 3.8 Hz, H-1), 4.57 (1H, dd, J = 1.6, 3.8 Hz, H-2), 4.31 (1H, dt, J = 5.7, 6.8 Hz, H-5), 4.04 (1H, dd, J = 6.6, 8.5 Hz, H-6a), 3.91 (1H, dd, J = 1.6, 5.7 Hz, H-3), 3.83 (1H, dd, J = 6.8, 8.5 Hz, H-6b), 3.79 (1H, dd, J = 5.5 Hz, H-4), 1.54, 1.42, 1.35, 1.34 (12H, 4s, CH₃); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 114.2 (C(CH₃)₂), 109.8 (C(CH₃)₂), 104.6 (C-1), 85.5 (C-4), 82.9 (C-2), 74.4 (C-5), 65.4, 65.3 (C-3, C-6), 27.3, 26.7, 26.1, 25.0 (4 CH₃).



1,2,4,6-Tétra-*O*-acétyl-3-azido-3-déoxy-D-galactopyranose **1**:

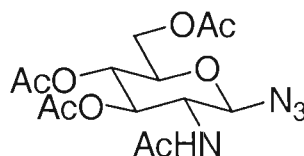
Le furanoside **38** (1.01 g, 3.54 mmol) a été dissous dans 90% TFA (10 mL) et agité à la température de la pièce pour 15 minutes. Le mélange a été évaporé sous pression réduite et l'huile résultante a été dissoute dans la pyridine (30 mL) et ensuite refroidi à 0°C. De l'anhydride acétique (20 mL) a été ajouté goûte-à-goûte et le mélange a été agité à la température de la pièce pour la nuit. Au matin, des morceaux de glaces ont été ajoutés au mélange, suivis par de l'acétate d'éthyle (15 mL). La phase aqueuse a été lavée à l'acétate d'éthyle (3 fois 15 mL) et les phases organiques combinées ont été lavées avec une solution de NaHCO₃ saturée (3 fois 15 mL). Le mélange a ensuite été séché avec du Na₂SO₄, filtré, concentré sous pression réduite et chromatographié sur gel de silice (1:1, acétate d'éthyle : hexane) pour l'obtention d'une huile claire dans un rendement quantitatif (1.32 g). Le composé **1** a été obtenu dans un mélange anomérique 1:1 (α : β). ¹H RMN partielle (300 MHz, CDCl₃): δ 6.33 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-1 α), 5.67 (1H, d, J = 8.2, H-1 β).



Phényl 3-azido-3-déoxy-2,4,6-tri-*O*-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose **39**:

À une solution de **1** (0.336 g, 0.895 mmol) dans le DCM sec (9 mL), a été ajoutée le benzénethiol suivi du BF₃.OEt₂ (0.224 mL, 1.79 mmol) ajouté goûte-à-goûte. Le mélange a été agité pendant 4 heures, lavé avec une solution de NaHCO₃ saturée (3 fois 15 mL), d'eau (3 fois 15 mL) et de la saumure (3 fois 15 mL). La phase

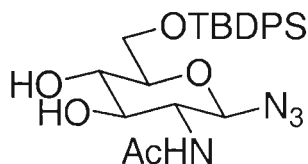
organique a été séchée avec du Na_2SO_4 , filtrée et concentrée sous pression réduite et chromatographiée sur gel de silice avec un mélange 2:1 (hexane : acétate d'éthyle). Le solide blanc a été obtenu dans un rendement de 68 % (0.257 g). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.53-7.50 (2H, m, H_{AR}), 7.34-7.29 (3H, m, H_{AR}), 5.44 (1H, dd, J = 3.0 Hz, H-4), 5.22 (1H, dd, J = 10.2 Hz, H-2), 4.69 (1H, d, J = 9.9 Hz, H-1), 4.13-3.91 (2H, m, H-6a, H-6b), 3.89 (1H, ddd, J = 6.6 Hz, H-5), 3.64 (1H, dd, J = 3.5, 10.1 Hz, H-3); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 170.3, 169.9, 169.3 (3 COCH_3), 132.4, 128.8, 128.13 (4 C_{AR}), 86.8 (C-1), 75.2 (C-5), 68.3 (C-4), 67.7 (C-2), 62.8 (C-3), 61.8 (C-6), 20.8, 20.6, 20.5 (3 COCH_3).



1-Azido-2-acétamido-3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-déoxy- β -D-glucopyranosyle **41**:

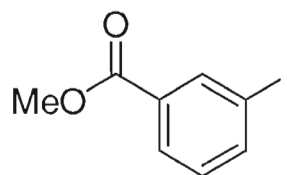
À une solution de chlorure de 2-acétamido-3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-déoxy- α -D-glucopyranosyle **40** (10 g, 27.3 mmol), TBAHS (13.9 g, 41 mmol) et d'azoture de sodium (3.55 g, 54.6 mmol) dans le DCM (100 mL) a été ajouté une solution 1M Na_2CO_3 (100 mL). Les deux phases ont été agitées vigoureusement pendant deux heures à la température de la pièce. La phase organique a été séparée, lavée avec de l'eau (3 fois 15 mL), séchée avec du Na_2SO_4 , filtrée et concentrée sous pression réduite et chromatographiée sur gel de silice (5% MeOH dans le DCM). Le composé **41** a été obtenu dans un rendement de 79% sous forme d'un solide blanc. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5.53 (1H, d, J = 8.7 Hz, NH), 5.25 (1H, dd, J = 9.34 Hz, H-3), 5.11 (1H, dd, J = 9.6 Hz, H-4), 4.75 (1H, d, J = 9.3 Hz, H-1), 4.28 (1H, dd, J = 4.9, 12.6 Hz, H-6a), 4.17 (1H, dd, J = 11.8 Hz, H-6b), 3.91 (1H, dd, J = 9.34 Hz, H-2), 3.80 (1H, ddd, J = 2.2 Hz, H-5), 2.18, 2.12, 2.05, 1.99 (12 H, 4s, 3 OAc, NHAc); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 171.0, 170.6, 170.2, 169.2 (4 COCH_3), 88.4 (C-1), 74.0

(C-3), 72.1 (C-5), 67.9 (C-4), 61.8 (C-6), 54.2 (C-2), 23.2, 20.7, 20.6, 20.5 (4 COCH_3).



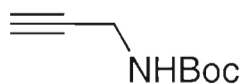
1-Azido-2-acétamido-6-*O*-tert-butyldiphénylsilyl-2-déoxy- β -D-glucopyranosyl **32**:

À une solution de **42** (1.7 g, 6.9 mmol) dans la pyridine sèche (20 mL) a été ajouté le tert-butylchlorodiphényle silane (2.15 mL, 8.28 mmol) et le mélange a été agité pendant 6 heures à la température de la pièce. Des morceaux de glace ont été ajoutés à la réaction et a ensuite été extraite avec du DCM. Les phases organiques combinées ont été lavées successivement avec une solution de 5% d'acide chloridrique (15 mL), une solution de NaHCO_3 (3 fois 15 mL) et de l'eau (3 fois 15 mL). Les extraits organiques ont été séchés avec du Na_2SO_4 , filtrés, concentrés sous pression réduite et chromatographiés sur gel de silice (9:1, DCM : MeOH). Le composé **32** est une huile jaunâtre obtenu dans un rendement de 77 % (2.57 g). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.67-7.64 (4H, m, H_{AR}), 7.41-7.23 (6H, m, H_{AR}), 5.62 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, NH), 4.65 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H-1), 3.92-3.91 (2H, m, H-6a, H-6b), 3.74-3.62 (2H, m, H-3, H-4), 3.50-3.42 (2H, m, H-2, H-5), 2.05 (3H, s, COCH_3), 0.95 (9H, s, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 172.5 (COCH_3), 135.5, 133.0, 132.9, 129.7, 127.7 (12 C_{AR}), 88.1 (C-1), 77.6 (C-5), 74.5 (C-3), 71.1 (C-4), 63.5 (C-6), 55.6 (C-2), 26.6 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 23.3 (COCH_3), 19.1 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$).



Méthyle 3-iodobenzoate **20**:

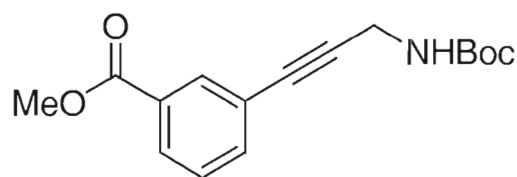
Une solution d'acide 3-iodobenzoïque (0.500 g), de MeOH (17 mL) et d'acide sulfurique concentré (0.13 mL) a été chauffé à reflux pour la nuit. Au matin, le mélange a été concentré sous pression réduite, dissout dans l'acétate d'éthyle (20 mL), lavé avec une solution de NaHCO₃ (3 fois 20 mL), saumure (3 fois 20 mL) et d'eau (3 fois 20 mL). Les phases organiques ont été séchées avec du Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le composé **20** (rendement quantitatif) est une huile jaune qui a été utilisée pour la prochaine étape sans autre purification. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.33 (1H, s, H-2), 7.94 (1H, d, J = 7.69 Hz, H-5), 7.82 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-4), 7.14 (1H, t, J = 7.9 Hz, H-5), 3.88 (3H, s, COOCH₃); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 165.3 (COOCH₃), 141.5 (C-4), 138.2 (C-2), 131.8 (C-1), 129.8 (C-5), 128.5 (C-6), 93.6 (C-3), 52.21 (COOCH₃).



t-butyl prop-2-ynylcarbamate:

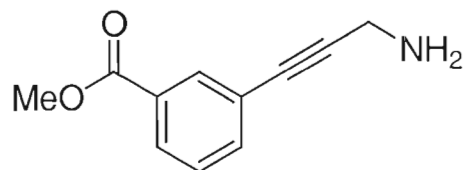
De la propargylamine (1.03 mL, 15 mmol) a été dissoute dans l'eau (23 mL), du NaHCO₃ (1.26 g) a été ajouté suivi de Boc₂O (3.44 mL, 15 mmol), préalablement dissous dans le CHCl₃ (31 mL) goûte-à-goûte. Le mélange a été agité pendant 3 heures et la phase aqueuse a été lavée avec le CHCl₃ (3 fois 20 mL). Les phases organiques combinées ont été lavées avec de l'eau (3 fois 20 mL), séchées avec du Na₂SO₄, filtrées, concentrées sous pression réduite et chromatographiées sur gel de

silice utilisant un mélange 7:1 (hexane : acétate d'éthyle). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 4.69 (1H, s, NH), 3.93 (2H, s, CH_2), 2.22 (1H, t, CH), 1.46 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).



t-butyl 3-(3-(méthoxycarbonyl)phényl)prop-2-ynylcarbamate **21**:

Le composé **20** (0.47g, 1.8mmol) a été dissous dans un mélange de DMF (20mL) et de Et_3N (20 mL) dans lequel a été ajouté $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ (0.06 g, 0.09 mmol) et le *t*-butyl prop-2-ynylcarbamate (0.42 g, 2.7 mmol). Après 2 heures d'agitation sous azote à 60°C , le mélange a été concentré sous pression réduite et chromatographié sur gel de silice avec un mélange d'éluant de 7:1 (hexane : acétate d'éthyle). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.09 (1H, s, H-2), 7.98 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-6), 7.58 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-4), 7.38 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-5), 4.79 (1H, s, NH), 4.16 (2H, s, CH_2), 3.92 (3H, s, COOCH_3), 1.48 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).



3-(3-amino-prop-1-yl)-benzoic acid methyl ester **22**:

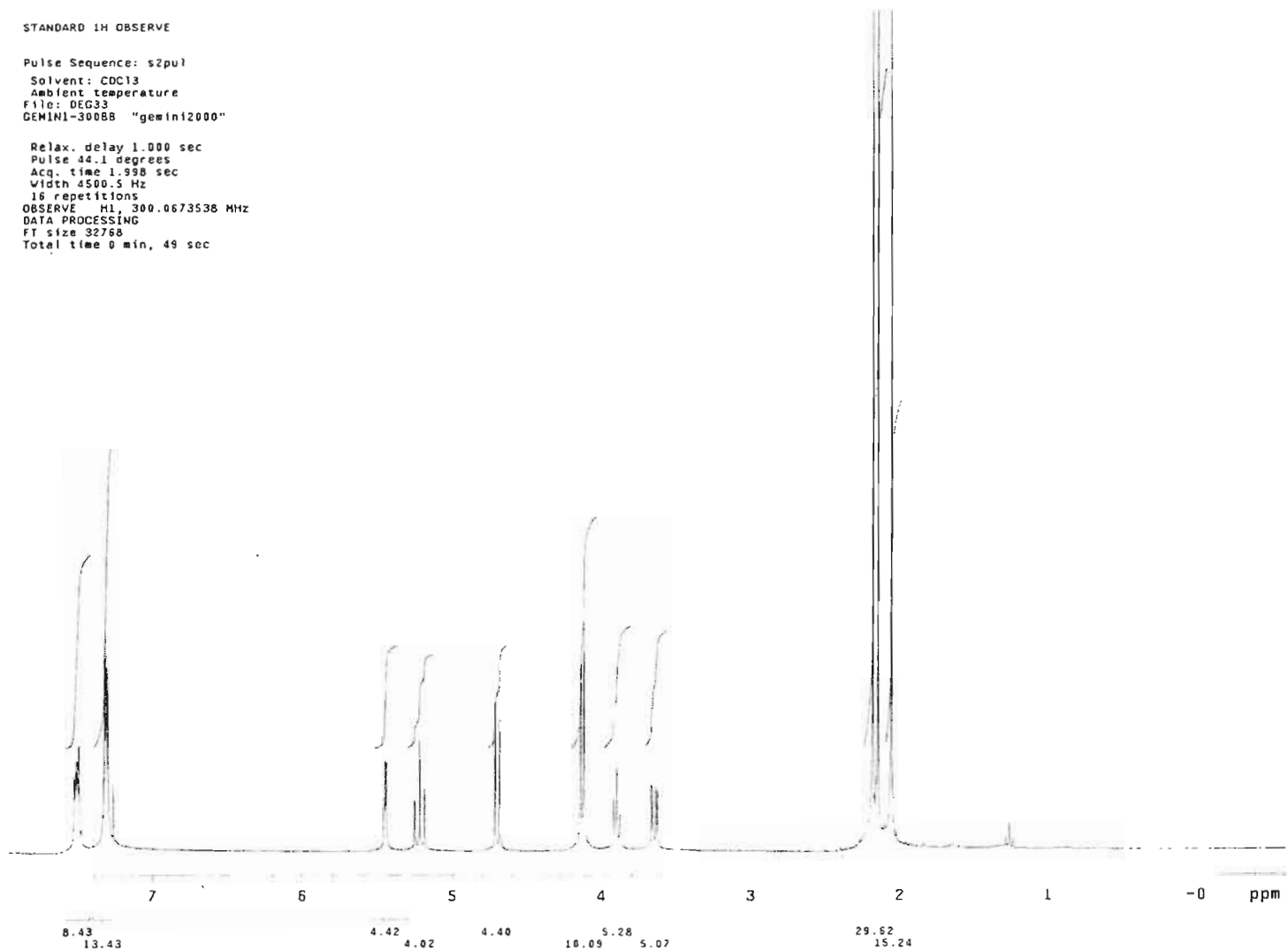
Le composé **21** (0.10 g, 0.34 mmol) a été dissous dans le DCM (5 mL), TFA (2 mL) a été ajouté, puis agité pendant 2 heures. Le mélange a été concentré sous pression réduite pour donner une huile brune (**22**) dans un rendement quantitatif. ^1H RMN

(300 MHz, CDCl_3): δ 8.25 (s, 2H, NH_2), 7.99 (1H, s, H-2), 7.93 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-6), 7.50 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-4), 7.32 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-5), 4.01 (2H, s, CH_2), 3.88 (3H, s, COOCH_3); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 166.5 (COOCH_3), 135.8, 132.8, 130.0, 129.9, 128.4, 121.6 (6 C_{AR}), 86.0 (CCCH_2), 80.2 (CCCH_2), 52.3 (COCH_3), 30.2 (CCCH_2).

Spectre ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) du composé 39.

STANDARD 1H OBSERVE
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl_3
Ambient temperature
File: DEG33
GEMINI-30088 "gemin12000"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 44.1 degrees
Acq. time 1.998 sec
Width 4500.5 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 300.0673538 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min, 49 sec



Spectre ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) du composé 39.

^{13}C OBSERVE

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: CDCl_3

Ambient temperature

GEHINI-30088 "gemin2000"

Pulse 54.2 degrees

Acq. time 1.815 sec

Width 18761.7 Hz

656 repetitions

OBSERVE C13 , 75.4519986 MHz

DECOUPLE H1 , 300.0688577 MHz

Power 39 dB

Continuously on

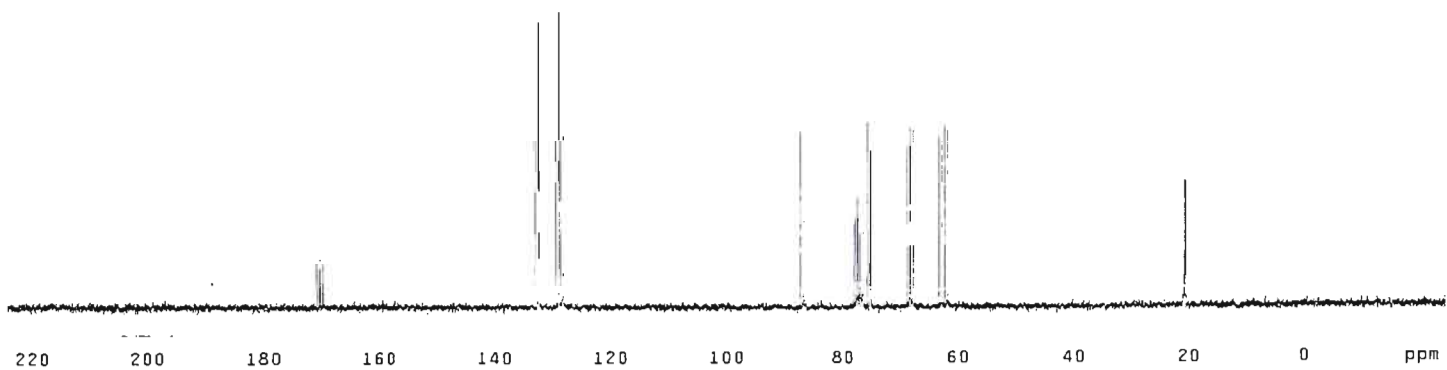
VALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

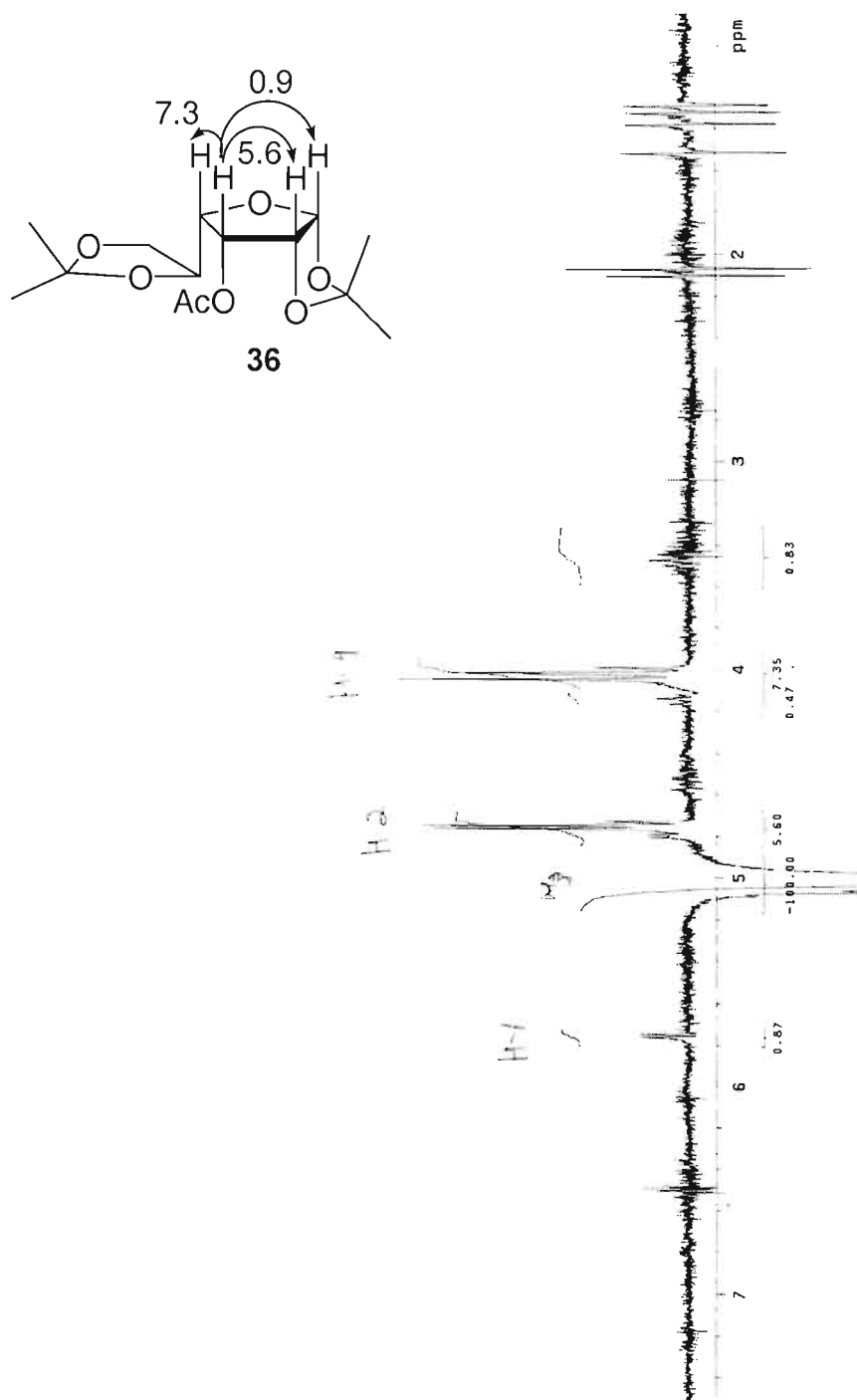
FT size 131072

Total time 58 hr, 41 min, 32 sec



STANDARD 1H OBSERVE

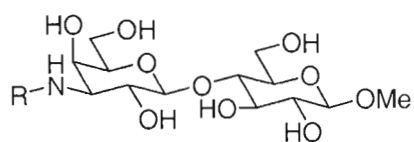
Pulse Sequence: noedif



Spectre nOe (300 MHz, CDCl₃) du composé **36**.

« Training set » relatif au manuscrit 2.4 : Tous les composés ont été tirés de la littérature et décrite dans leurs références appropriées. Toutes les molécules sont montrées ainsi que leur pouvoir inhibiteur.

Modification en position-3' d'un dérivé LacNAc synthétisé par le groupe de Nilsson⁴ : 12 composés.



1, R= H

8, R= CH₃SO₂

2, R=Ac

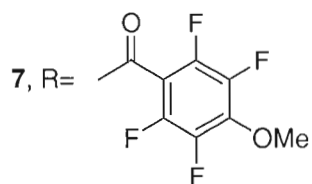
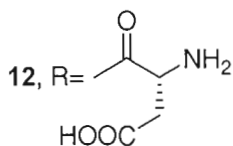
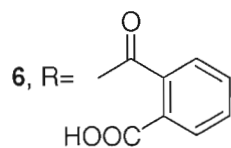
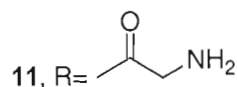
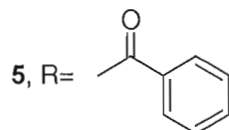
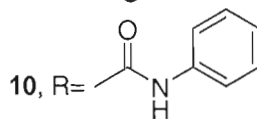
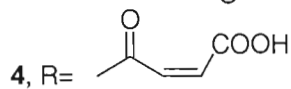
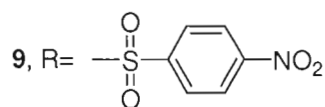
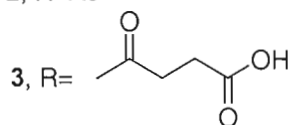


Tableau 1 Inhibition relative (%) des composés 1-12 et quelques IC₅₀ associés.

Composé (No.)	Inhibition relative (%) ^a	Composé (No.)	Inhibition relative (%) ^a
1	5	7	95 (4.4)
2	35 (118)	8	20
3	30	9	10
4	32	10	8
5	60 (14)	11	5
6	70 (13)	12	15

^a: Entre parenthèses sont les IC₅₀ (μM).

Dérivés profitant de l'interaction arginine-arène synthétisés par le groupe de Nilsson⁵ : 56 composés.

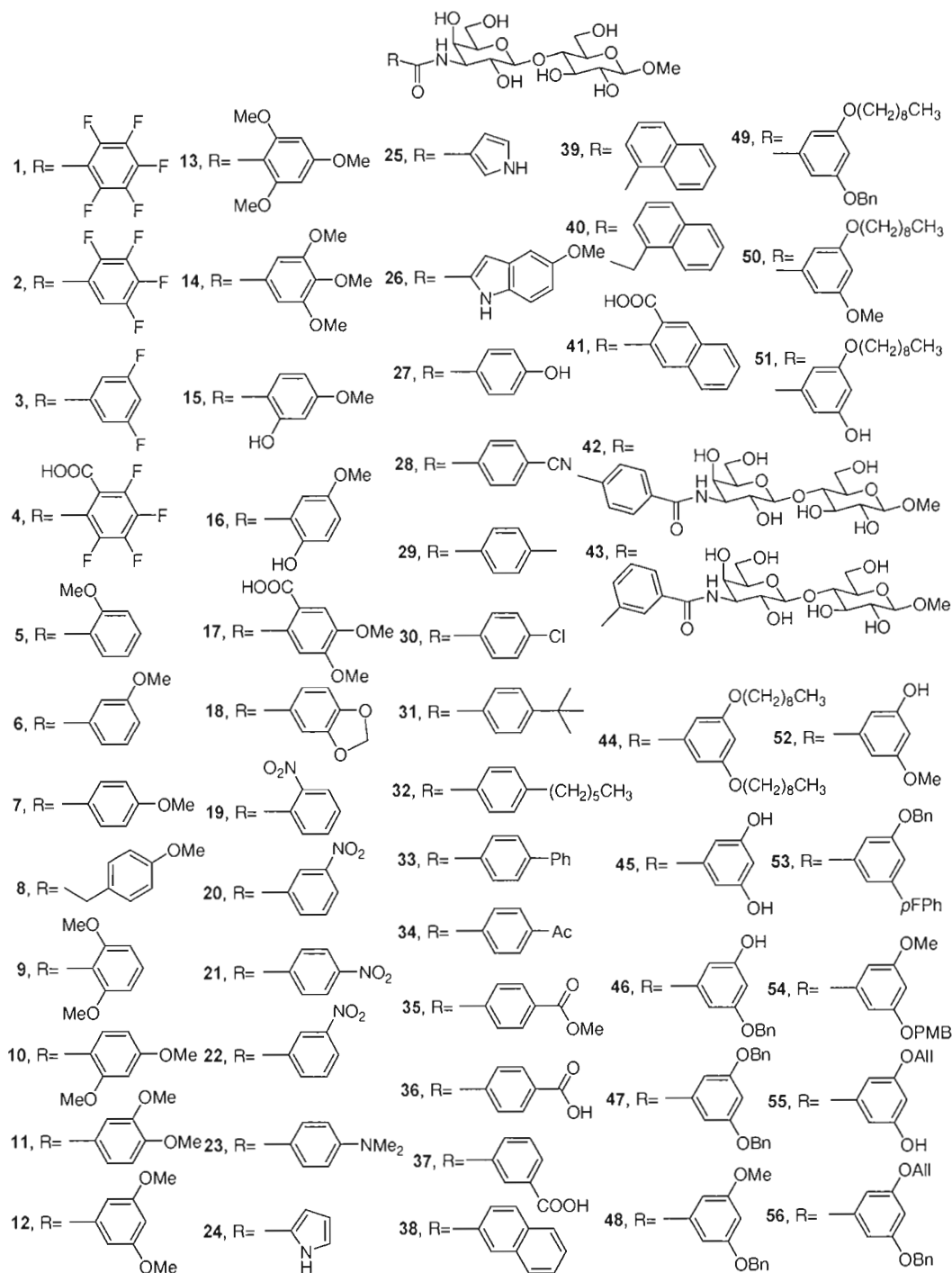


Tableau 2 Dérivés synthétiques du LacNAc **1-56** possédant un amide aromatique en position-3'. Les K_d (μM) ont été déterminés par un essai de polarisation de fluorescence compétitive.

Composé (No.)	K_d (μM)	Composé (No.)	K_d (μM)
1	55	29	1.3
2	6.7	30	2.5
3	26	31	0.95
4	11	32	11
5	13	33	3.8
6	2.5	34	1.2
7	3.6	35	3.5
8	18	36	4.6
9	29	37	3.0
10	7.9	38	0.48
11	4.0	39	4.4
12	1.1	40	9.6
13	17	41	0.32
14	7.8	42	8.9
15	10	43	5.7
16	7.5	44	>100
17	4.6	45	4.2
18	2.7	46	2.1
19	4.2	47	2.3
20	2.9	48	1.6
21	0.95	49	1.6
22	7.3	50	6.1
23	3.7	51	2.6
24	30	52	1.6
25	33	53	2.8
26	6.1	54	2.5
27	8.2	55	1.9
28	3.9	56	3.4

Dérivés bis-benzamido thiodigalactoside C_2 -symétrique synthétisés par le groupe Nilsson⁶ : 4 composés.

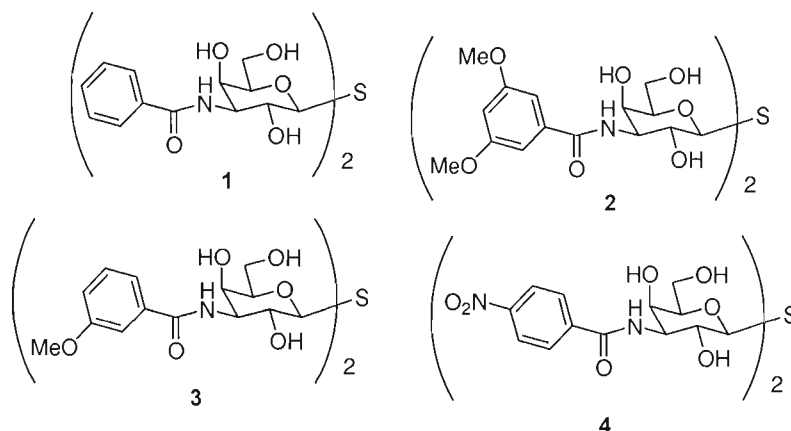


Tableau 3 K_d des dérivés bis-benzamido thiodigalactoside C_2 -symétrique 1-4.

Composé (No.)	K_d (nM)	Composé (No.)	K_d (nM)
1	3000	3	50
2	61	4	33

Dérivés 3-(1,2,3-triazol-1-yl)-1-thio-galactosides synthétisés par le groupe de Nilsson⁷ : 10 composés.

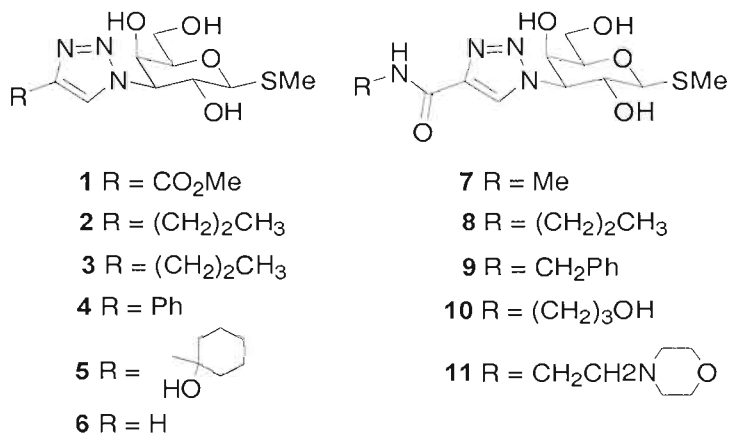
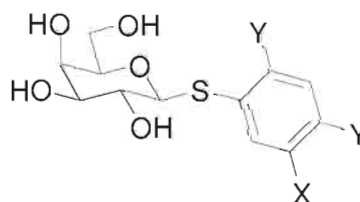


Tableau 4 K_d (μM) des dérivés 3-(1,2,3-triazol-1-yl)-1-thio-galactosides **1-10**.

Composé (No.)	K_d (μM)	Composé (No.)	K_d (μM)
1	1408	6	230
2	4600	7	124
3	147	8	107
4	1750	9	386
5	20000	10	571

Dérivés phényl thio- β -D-galactopyranoside synthétisés par le groupe de Nilsson⁸: 6 composés.

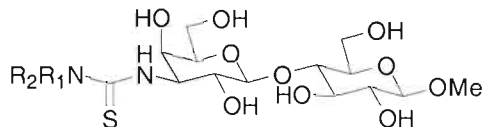


- | | |
|-------------------------------|--|
| 1 X = NAcAll, Y = NHAc | 4 X = NHBn, Y = NO ₂ |
| 2 X = NAcBn, Y = NHAc | 5 X = NHBu, Y = NO ₂ |
| 3 X = SBn, Y = NHAc | 6 X = NHPh, Y = NO ₂ |

Tableau 5 K_d (mM) des dérivés phényl thio- β -D-galactopyranoside **1-6**.

Composé (No.)	K_d (mM)	Composé (No.)	K_d (mM)
1	1.8	4	0.77
2	1.5	5	0.75
3	1.8	6	1.0

Dérivés thiouré N-acétyllactosamine synthétisés par le groupe de Nilsson⁹: 13 composés.



- | | |
|---|--|
| 1 $R_1 = R_2 = H$ | 8 $R_1 = \text{Phenyl}, R_2 = H$ |
| 2 $R_1 = \text{Me}, R_2 = H$ | 9 $R_1 = \text{Benzyl}, R_2 = H$ |
| 3 $R_1 = \text{Allyl}, R_2 = H$ | 10 $R_1 = 3\text{-Pyridylmethyl}, R_2 = H$ |
| 4 $R_1 = \text{Bu}, R_2 = H$ | 11 $R_1 = \text{Cyclohexyl}, R_2 = H$ |
| 5 $R_1 = R_2 = \text{Et}$ | 12 $R_1 = R_2 = N\text{-Morpholinyl}$ |
| 6 $R_1 = 2\text{-hydroxyethyl}, R_2 = H$ | 13 $R_1 = \text{Methyl } 2\text{-acetamido-2,3'-dideoxy-}\beta\text{-lactosid-3'-yl}, R_2 = H$ |
| 7 $R_1 = 3\text{-hydroxypropyl}, R_2 = H$ | |

Tableau 6 K_d (μM) des dérivés thiouré N-acétyllactosamine 1-13.

Composé (No.)	K_d (μM)	Composé (No.)	K_d (μM)
1	65	8	40
2	38	9	15
3	52	10	35
4	23	11	57
5	43	12	69
6	74	13	160
7	65		

Dérivé aminothiazoline synthétisé par le groupe de Pieters¹⁰: 1 composé.

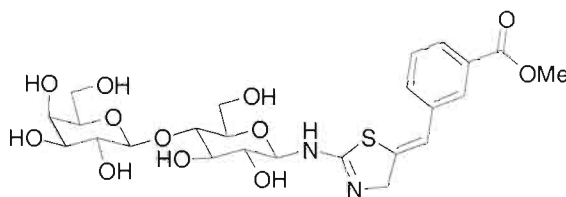


Tableau 7 IC_{50} (μM) du dérivé aminothiazoline.

Composé (No.)	IC_{50} (μM)
1	21

Dérivés *O*-glactosyl aldoxime synthétisés par le groupe de Nilsson¹¹ : 51 composés.

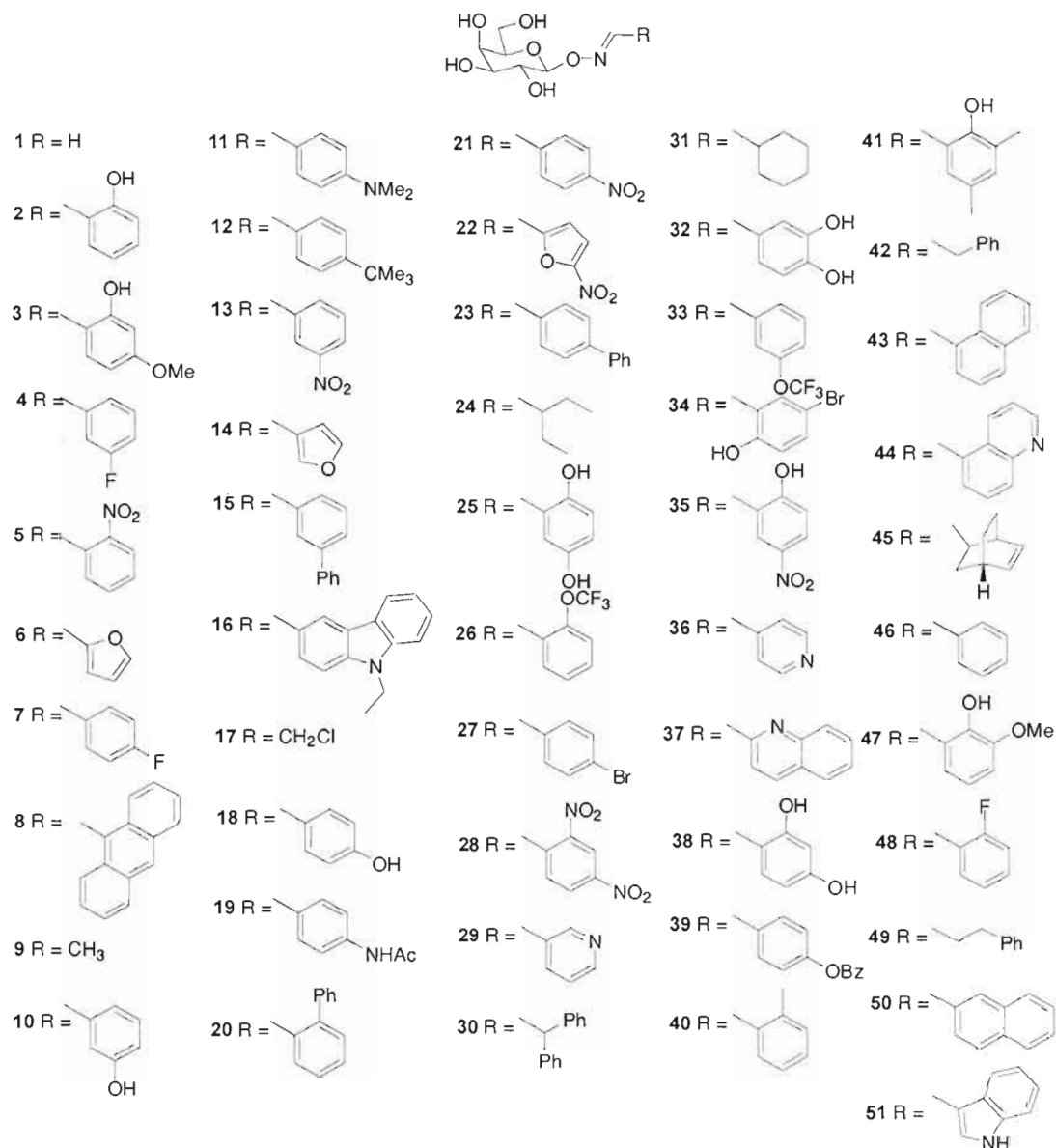


Tableau 8 K_d (μM) des dérivés *O*-glactosyl aldoxime 1-51.

Composé (No.)	K_d (μM)	Composé (No.)	K_d (μM)
1	8860	27	691
2	1193	28	1830
3	1739	29	3321
4	1589	30	7183
5	9263	31	4819
6	6365	32	626
7	3124	33	2161
8	2452	34	649
9	5968	35	359
10	1835	36	10902
11	9011	37	1417
12	4815	38	840
13	527	39	19968
14	27740	40	5669
15	1243	41	2578
16	2206	42	45352
17	5259	43	369
18	4771	44	623
19	4071	45	4791
20	2880	46	3473
21	2242	47	1678
22	1556	48	10300
23	5981	49	11390
24	7280	50	1239
25	776	51	331
26	3777		

Références :

- 1 (a) Reckendorf, W. M. zu *Methods Carbohydr. Chem.*, R. L. Whistler and J. N. BeMiller, Eds.; Academic Press: New York, **1972**, 6, 129-131; (b) Lowary, T. L.; Hindsgaul, O. *Carbohydr. Res.* **1994**, 251, 33.
- 2 Gan, Z.; Cao, S.; Wu, Q.; Roy, R. *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, 18, 755.
- 3 Vrasidas, I.; Kemmink, J.; Linskamp, R. M. J.; Pieters, R. *J. Org. Lett.* **2002**, 4, 1807.
- 4 Sörme, P.; Qian, Y.; Nyholm, P.-G.; Leffler, H.; Nilsson, U. *J. ChemBioChem.* **2002**, 3, 183.
- 5 Sörme, P.; Arnoux, P.; Kahl-Knutsson, B.; Leffler, H.; Rini, J. M. Nilsson, U. *J. J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1737.
- 6 Cumpstey, I.; Sundin, A.; Leffler, H.; Nilsson, U. *J. Angew. Chem. Int. Ed* **2005**, 44, 5110.
- 7 Salameh, B. A.; Leffler, H.; Nilsson, U. *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 3344
- 8 Cumpstey, I.; Carlsson, S.; Leffler, H.; Nilsson, U. *J. Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1922
- 9 Salameh, B. A.; Sundin, A.; Leffler, H.; Nilsson, U. *J. Bioorg. Med. Chem.* **2005**, asap.
- 10 Vrasidas, I.; André, S.; Valentini, P.; Böck, C.; Lensch, M.; Kaltner, H.; Liskamp, R. M. J.; Gabius, H.-J.; Pieters, R. *J. Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 803.
- 11 Tejler, J.; Leffler, H.; Nilsson, U. *J. Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 15, 2343.